



POLITÉCNICO DE COIMBRA
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA

ANTÓNIO MANUEL CALADO DE OLIVEIRA MARTINS

Implementação da ISO 14189 (2013)- *Water Quality- Enumeration of Clostridium perfringens- Method using membrane filtration*

ORIENTADORA: PROFESSORA ADJUNTA PAULA AMADOR

COIMBRA, 2018



POLITÉCNICO DE COIMBRA
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA

ANTÓNIO MANUEL CALADO DE OLIVEIRA MARTINS

Implementação da ISO 14189 (2013)- *Water Quality- Enumeration of Clostridium perfringens- Method using membrane filtration*

ORIENTADORA: PROFESSORA ADJUNTA PAULA AMADOR

Relatório de Estágio Profissionalizante apresentado à Escola Superior Agrária de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar

COIMBRA, 2018

RESUMO

Embora não sendo rápida, a análise microbiológica de sistemas de abastecimento de água indica com sensibilidade uma possível contaminação. A espécie *Clostridium perfringens* forma endósporos, as formas mais resistentes ao tratamento quando comparados com células vegetativas.

Com a implementação da Norma ISO 14189 (2013)- *Water Quality- Enumeration of Clostridium perfringens- Method using membrane filtration*, o Setor de Análises Microbiológicas do Laboratório de Controlo de Qualidade dos Serviços Municipalizados de Água e Saneamento de Leiria pretende dar cumprimento ao preconizado no Decreto-Lei n.º 152/ 2017, de 7 de dezembro, ficando assim assegurada a transição da acreditação do parâmetro pelo método analítico atual para o estipulado no anexo IV do Decreto-Lei n.º 306/ 2007.

A implementação deste método segue o Procedimento Auxiliar de Microbiologia definido pelo Laboratório evidenciando objetivamente que os requisitos específicos nesta Norma ISO são cumpridos.

PALAVRAS-CHAVE: Implementação; *Clostridium perfringens*; Fosfatase.

ABSTRACT

Although not rapid, the microbiological analysis of water supply systems indicates with sensitivity a possible contamination. The species *Clostridium perfringens* forms endospores, the forms more resistant to the treatment when compared with vegetative cells.

With the implementation of the Standard ISO 14189 (2013)- Water quality- Enumeration of *Clostridium perfringens* - Membrane filtration method, the Microbiological Analysis Setor of the Quality Control Laboratory of Municipal Water and Sanitation Services of Leiria, is intended to comply with Decree-Law no.º 152/ 2017, dated December 7, thus ensuring the transition of the accreditation of the parameter by the current analytical method to that stipulated in Annex IV of Decree-Law n.º 306/2007.

An implementation of this method follows the Auxiliary Procedure of Microbiology defined by the Laboratory showing objective that the specific requirements in this Standard ISO are fulfilled.

KEY-WORDS: Implementation; *Clostridium perfringens*; Fosfatase

ÍNDICE

	PÁGINA
1 Âmbito e objetivo	1
2 Apresentação da Instituição	1
2.1 Os SMAS de Leiria	1
2.2 O Laboratório de Controlo de Qualidade	3
3 Colheita de amostras	7
4 <i>Clostridium perfringens</i>	11
5 O método atual (método interno)	12
5.1 Confirmação de <i>C. perfringens</i>	12
6 O método ISO a implementar	13
6.1 Levantamento de necessidades do método ISO a implementar	17
6.2 Pessoal	18
6.3 Equipamento	19
6.4 Análise à qualidade do ar e às superfícies	22
6.4.1 Técnica a utilizar	23
6.4.2 Análise dos resultados	23
6.4.3 Descontaminação	24
6.5 Receção, preparação e controlo dos meios de cultura e reagentes	25
6.5.1 Receção dos meios de cultura e reagentes	26
6.5.2 Preparação do meio de cultura	26
6.5.3 Controlo de qualidade do produto final	29
6.5.4 Preparação do reagente para o teste da fosfatase ácida	31
6.6 Controlo de qualidade na utilização do método	33

6.6.1 Controlo de qualidade interno (CQI)	33
6.6.2 Controlo da qualidade externo (CQE)	35
7 A implementação do método	36
7.1 Ensaaios interlaboratoriais (EIL)	36
7.2 Carta Guia	37
7.3 Ensaio em Branco	39
7.4 Controlo positivo	40
7.5 Valores da incerteza intrínseca, intrínseca relativa, operacional e operacional relativa	42
7.6 Repetibilidade e reprodutibilidade	44
8 A Auditoria interna	45
9 Considerações finais	46
10 Bibliografia	48

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
FIGURA 1- ORGANOGRAMA- SMAS DE LEIRIA	2
FIGURA 2- TELEGESTÃO- SMAS DE LEIRIA	2
FIGURA 3- ORGANOGRAMA- LABORATÓRIO DE CONTROLO DE QUALIDADE	4
FIGURA 4- ORGANOGRAMA- ESTRUTURA DOCUMENTAL	5
FIGURA 5- SALA DE INCUBAÇÕES	6
FIGURA 6- SALA DE PREPARAÇÃO E CONTROLO DE MEIOS DE CULTURA	7
FIGURA 7- FILTRAÇÃO PELO SISTEMA <i>NALGENE</i>	14
FIGURA 8- INCUBAÇÃO A 44°C EM <i>ANAEROJAR</i>	15
FIGURA 9- <i>LABGUARD</i>	16
FIGURA10- COLÓNIAS DE <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> PRESUMÍVEIS EM TSC AGAR	16
FIGURA 11- CONTROLO POSITIVO E CONTROLO NEGATIVO AO TESTE DA FOSFATASE	17
FIGURA 12- AMOSTRAS DE <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> FOSFATASE POSITIVAS	17
FIGURA 13- MATRIZ DE QUALIFICAÇÃO	19
FIGURA 14- FILTRAÇÃO DO REAGENTE DO TESTE DA FOSFATASE	32
FIGURA 15- MATERIAL DE REFERÊNCIA WDCM	33

ÍNDICE DE TABELAS

	PÁGINA
TABELA 1- DECRETO-LEI N.º306/2007 PARÂMETROS ANALISADOS	4
TABELA 2- BALANÇA ENSAIO DE EXATIDÃO	21
TABELA 3- RESULTADOS DA ANÁLISE AO AR E ÀS SUPERFÍCIES (UFC/ PLACA DE PETRI)	24
TABELA 4- ESPECIFICAÇÕES PARA A QUALIDADE DA ÁGUA	27
TABELA 5- ESPECIFICAÇÕES PARA A DISTRIBUIÇÃO DOS MEIOS	28
TABELA 6- REGISTO DE PREPARAÇÃO DO LOTE INTERNO 94 DE TSC AGAR	31
TABELA 7- REGISTO DE PREPARAÇÃO DO REAGENTE DO TESTE DA FOSFATASE ÁCIDA	33
TABELA 8- CONSTRUÇÃO DA CARTA GUIA	38
TABELA 9- CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA AS CARTAS GUIA	38
TABELA 10- CARTA GUIA – REGISTO DE DESEMPENHO DOS TÉCNICOS	39
TABELA 11- RESULTADOS DO ENSAIO DE BRANCOS	40
TABELA 12- RESULTADOS DO ENSAIO DE POSITIVOS	40
TABELA 13- DETERMINAÇÃO DO VALOR DO CRITÉRIO DE PRECISÃO E CARTA DE AMPLITUDE DE DUPLICADOS	41
TABELA 14- DETERMINAÇÃO DOS VALORES DA INCERTEZA	44
TABELA 15- DETERMINAÇÃO DA REPETIBILIDADE	45
TABELA 16- DETERMINAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE	45

ABREVIATURAS

aaaa- Ano

AMT- Amostra

AT- Anexo Técnico

BPL- Boas Práticas de Laboratórios

CAS- Chemical Abstracts Service

CO- Controlo Operacional

CP- Critério de Precisão

CQE- Controlo da Qualidade Externo

CQI- Controlo da Qualidade Interno

CSB- Câmara de Segurança Biológica

dd- Dia

EG- Entidade Gestora

EIL- Ensaio Interlaboratorial

EMA- Erro Máximo Admissível

ERSAR- Entidade Reguladora dos Serviços de Água e Resíduos

ETA- Estação de Tratamento de Águas de Abastecimento

FC- Folha de cálculo

GQ- Gestor da Qualidade

HEPA- High Efficiency Particulate Arrestance

IPAC- Instituto Português da Acreditação

ISO- International Standard Organization

Log- Logaritmo

mm- Mês

MOD- Impressos

MQ- Manual da Qualidade

MR- Material de Referência

PA- Procedimentos Auxiliares

PCQA- Plano de Controlo de Qualidade da Água

PSA- Plano de Segurança da Água

PT- Procedimentos Técnicos

RELACRE- Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal

RL- Responsável do Laboratório

RT_A- Responsável Técnico do Setor da Amostragem

RT_{FQ}- Responsável Técnico do Setor das Análises Físico- químicas

RT_M- Responsável Técnico do Setor das Análises Microbiológicas

SMAS- Serviços Municipalizados de Água e Saneamento

TSA- Tryptic Soy Agar

TSC- Triptose Sulfito Cicloserina

UTA- Unidade de Tratamento de Ar

VL- Valor Limite

WDCM- World Data Centre for Microorganisms

1 Âmbito e objetivo

Este estágio foi realizado no âmbito do Mestrado em Engenharia Alimentar no Setor de Análises Microbiológicas do Laboratório de Controlo de Qualidade dos Serviços Municipalizados de Água e Saneamento (SMAS) de Leiria e tem como objetivo a implementação para fins de acreditação do método da Norma *International Standard Organization* (ISO) 14189 (2013) *Water Quality- Enumeration of Clostridium perfringens- Method using membrane filtration*. Desta forma dá-se cumprimento ao preconizado no Decreto-Lei n.º 152/ 2017, de 7 de dezembro, ficando assim assegurada a transição da acreditação do parâmetro pelo método analítico atual para o estipulado no anexo IV do Decreto-Lei n.º 306/ 2007.

A natural seleção deste método teve em consideração os requisitos legais, requisitos do cliente, tipo de amostra (águas de consumo humano tratadas e não tratadas) e valores limite legais (0ufc/ 100ml).

Este estágio obedece a um rigoroso sigilo e integridade profissional. O autor compromete-se a manter a confidencialidade dos resultados analíticos dos diversos clientes.

2 Apresentação da Instituição

2.1 Os SMAS de Leiria

Os SMAS de Leiria foram criados em 1 de julho de 1933. Atualmente possuem uma estrutura orgânica independente da Câmara Municipal, com um órgão de gestão próprio— o Conselho de Administração, que é composto por três elementos, o Presidente da Câmara Municipal de Leiria e dois Vereadores.

Têm um mapa de pessoal próprio com 134 funcionários que permite efetuar uma gestão adequada dos recursos humanos e autonomia administrativa e financeira permitindo fazer face aos encargos de funcionamento e a alguns investimentos.

Não possuem personalidade jurídica, tendo contudo autonomia financeira. A figura 1 mostra a organização dos SMAS de Leiria.

Os SMAS de Leiria são responsáveis pela captação, tratamento e distribuição de água ao concelho de Leiria. Estes Serviços abastecem cerca de 127 mil habitantes, com 65 mil contadores instalados. Têm a seu cargo a gestão de 1780 Km de condutas excluindo ramais e 81 reservatórios.

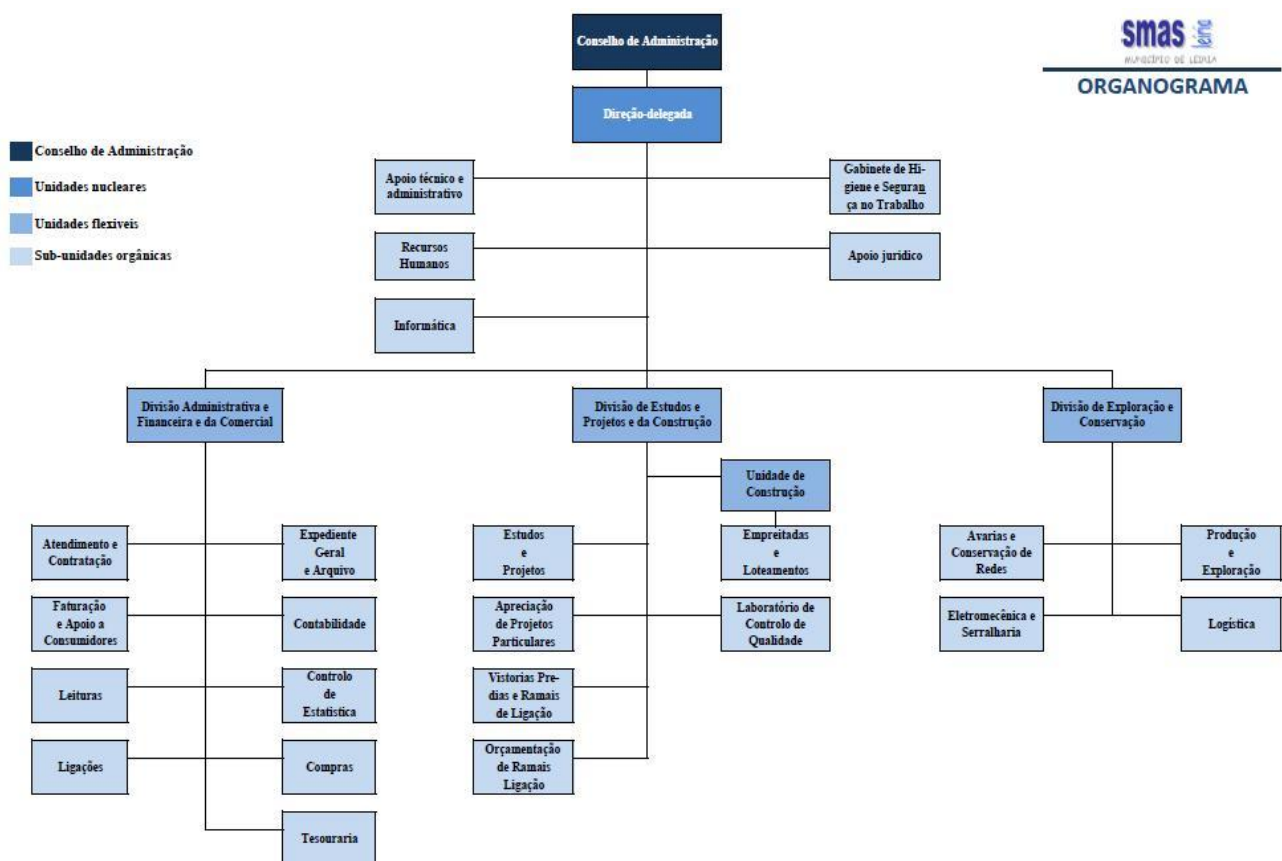


FIGURA 1- ORGANOGRAMA- SMAS DE LEIRIA

Os SMAS de Leiria fornecem diariamente 26 mil metros cúbicos de água para consumo humano o que equivale a 25 milhões de garrafas de litro por dia, correspondendo a 205 litros de água que cada leiriense consome por dia.

Possuem um eficiente sistema de Telegestão com 54% das infraestruturas monitorizadas com controlo do nível hidrodinâmico das captações, do nível de água nos reservatórios, dos perfis de consumo, do valor de pH e cloro residual na distribuição. A figura 2, a título ilustrativo, reproduz a solução de *software* utilizada pelos operadores na sala de comando.

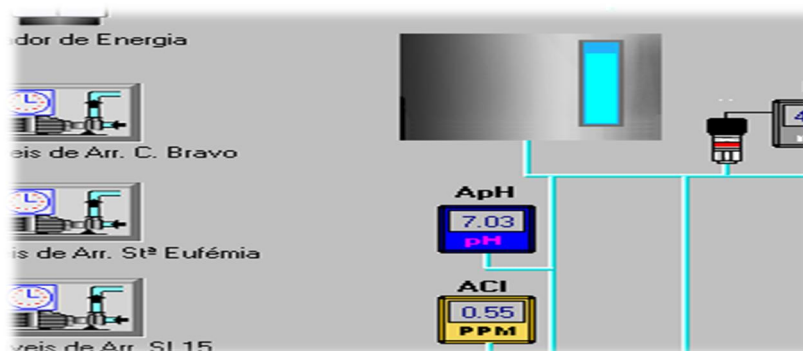


FIGURA 2- TELEGESTÃO- SMAS DE LEIRIA

Os SMAS de Leiria têm implementado o Iperdas- Plano eficiente de perdas de água e energia, e está em fase de implementação do Plano de Segurança da Água (PSA). Trata-se de uma metodologia detalhada de gestão de riscos para as Entidades Gestoras (EG) de Sistemas de abastecimento de água para consumo humano. Em agosto de 2017 desenvolveram uma aplicação móvel gratuita para *smartphones*-LizAqua com o objetivo de estar mais perto de todos os utilizadores do concelho da rede pública de água.

A captação superficial do rio Liz, é composta por um tratamento avançado com desarenamento, pré-oxidação, coagulação/ floculação, decantação, filtração em areia, adsorção em carvão ativado, desinfecção com radiação ultravioleta e desinfecção final com cloro gasoso. Nas captações subterrâneas efetua-se a correção de agressividade em cinco Estações de Tratamento de Água (ETA's) pela adição de leite de cal até se atingir o pH de saturação e desinfecção final com cloro gasoso ou hipoclorito de sódio.

2.2 O Laboratório de Controlo de Qualidade

O Laboratório de Controlo de Qualidade está inserido na Divisão de Estudos e Projetos e da Construção. Localizado inicialmente na ETA de S. Romão, existe desde 1958 apenas para efetuar análises Físico-Químicas, tendo sido remodelado em 1991, visando a realização de análises microbiológicas. Posteriormente foi sujeito a obras de ampliação na área das análises Físico-Químicas. Em 2009 foi transferido para novas instalações situadas em S. Romão.

Compete ao Laboratório efetuar o controlo de qualidade da água para consumo humano, assim como o controlo da água das captações e nos processos de tratamento, no âmbito do cumprimento da legislação em vigor conforme mostra a tabela 1, pela elaboração do Plano de Controlo de Qualidade da Água (PCQA) e do Controlo Operacional (CO). Deste modo estão definidos três tipos de controlo que se designam por controlo de rotina R1, rotina R2 e Inspeção a que correspondem determinados parâmetros.

O Laboratório desenvolve actividade no âmbito de investigação e coopera com outras entidades e setores. Realiza também análises da qualidade água quando solicitado pelos clientes externos nas matrizes de águas de piscina e fontenários.

TABELA 1- DECRETO-LEI N.º306/2007 PARÂMETROS ANALISADOS

Controlo	Parâmetro	Valor paramétrico
R1	Bactérias coliformes <i>Escherichia coli</i>	0ufc/100ml 0ufc/100ml
R2	Número de colónias a 36°C Número de colónias a 22°C <i>Clostridium perfringens</i>	Sem alteração Sem alteração 0ufc/100ml
Inspeção	<i>Enterococos</i>	0ufc/100ml

LEGENDA: R1- ROTINA 1; R2- ROTINA 2

O Laboratório de Controlo de Qualidade encontra-se subdividido em três Setores, nomeadamente, Análises Microbiológicas, Análises Físico-Químicas e Amostragem de acordo com o organograma da figura 3.

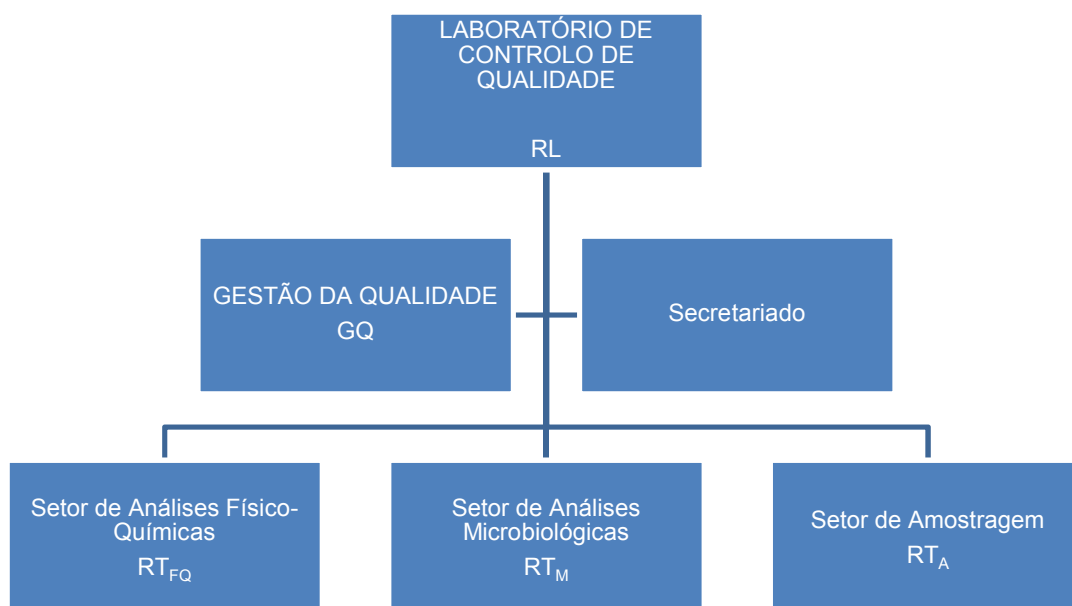


FIGURA 3- ORGANOGrama- LABORATÓRIO DE CONTROLO DE QUALIDADE

LEGENDA: RL- RESPONSÁVEL DO LABORATÓRIO; GQ- GESTOR DA QUALIDADE, RTFQ- RESPONSÁVEL TÉCNICO DO SETOR DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS; RTM- RESPONSÁVEL TÉCNICO DO SETOR DE ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS; RTA- RESPONSÁVEL TÉCNICO DO SETOR DE AMOSTRAGEM

O Laboratório está acreditado pelo Instituto Português da Acreditação (IPAC) desde 2010 de acordo com a NP EN ISO/IEC 17025, 2005- Requisitos gerais para Laboratórios de ensaio e calibração. A acreditação mostra o reconhecimento da competência técnica para a realização dos ensaios constantes do Anexo Técnico (AT). Este documento é o comprovativo da acreditação sendo disponibilizado aos clientes na fase de consulta e proposta para a realização de ensaios.

Os SMAS de Leiria definiram, para o Laboratório de Controlo de Qualidade, a seguinte Política:

“Satisfação de todos os seus clientes, colaboradores e fornecedores através da aplicação de boas práticas profissionais com vista à prestação de serviços de qualidade reconhecida. O Laboratório compromete-se a otimizar sistematicamente os seus procedimentos recorrendo à plena utilização dos seus recursos técnicos e humanos com vista à melhoria contínua dos seus serviços tendo em conta o cumprimento da legislação e da regulamentação aplicável”

O Sistema de Gestão Documental estabelecido apoia-se numa estrutura baseada nos documentos que se apresentam na figura 4.

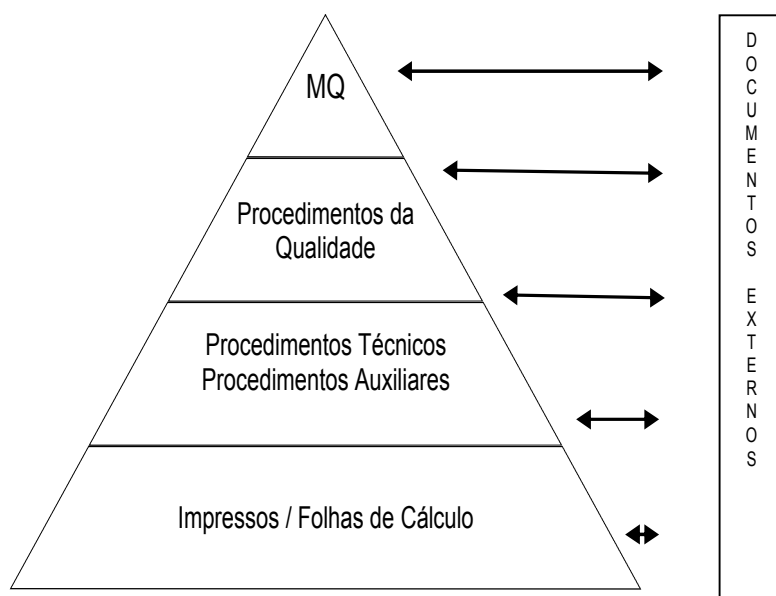


FIGURA 4- ORGANOGRAMA- ESTRUTURA DOCUMENTAL

LEGENDA: MQ- MANUAL DA QUALIDADE

DOCUMENTOS INTERNOS

O Manual da Qualidade (MQ) inclui as Políticas e Procedimentos adotados pelo Laboratório, no sentido de satisfazer os requisitos da Norma. Cada Procedimento da Qualidade (PQ) definido corresponde a um requisito da Norma de referência. Os Métodos de Análise correspondem a Procedimentos Técnicos (PT). Os Procedimentos Auxiliares (PA) são utilizados sempre que se considera necessário especificar a execução de alguma tarefa, independentemente da sua natureza. Os Impressos (MOD) são folhas- modelo utilizadas na recolha de dados e as folhas de cálculo (FC) são folhas- modelo utilizadas no tratamento de dados.

DOCUMENTOS EXTERNOS

Consideram-se como sendo parte integrante do Sistema de Gestão do Laboratório de Controlo de Qualidade dos SMAS de Leiria, os documentos de origem externa que regulamentam as suas atividades, como por exemplo legislação, normas ou diretivas de carácter técnico. Estes documentos encontram-se listados e controlados de acordo com o previsto no Procedimento de controlo dos documentos.

A atividade laboratorial dá origem a registos que constituem a evidência de funcionamento do Laboratório e do seu Sistema de Gestão, que são controlados de acordo com o estipulado no controlo dos registos da qualidade.

O Setor de Análises Microbiológicas dispõe das várias salas que respeitam o princípio da marcha em frente. Uma antecâmara dá acesso direto à sala de filtrações e incorporações, seguindo-se as incubações (figura 5), leituras e repicagens, descontaminação, lavagem e preparação de material e sala de preparação de meios de cultura (figura 6).



FIGURA 5- SALA DE INCUBAÇÕES

A admissão de ar é efetuada através de uma Unidade de Tratamento de Ar (UTA) de ar novo que garante uma pressão positiva. Está instalado um sistema de hierarquização de pressão ambiente por controlo dos caudais de admissão e exaustão em cada uma das salas. A pressurização de cada uma das salas relativamente aos espaços adjacentes é garantida através do excesso de caudal insuflado relativamente aos caudais extraídos.

Nos espaços correspondentes a este Setor é controlada também a humidade relativa.

O acesso é restrito e condicionado sendo efetuado através de um cartão com comando de abertura de portas.



FIGURA 6- SALA DE PREPARAÇÃO E CONTROLO DE MEIOS DE CULTURA

3 Colheita de amostras

A colheita de amostras de água a partir da torneira para análises microbiológicas (águas de consumo tratada e não tratada) encontra-se acreditada constando do AT de Acreditação do Laboratório de Controlo de Qualidade.

O Responsável Técnico da Amostragem define, garante e implementa a execução da metodologia das colheitas levadas a cabo pelos Técnicos qualificados.

A descrição do material e equipamento implementado para se realizarem as colheitas inclui: frascos de colheita, maçarico e recargas portáteis, álcool a 70%, copo pequeno de plástico, isqueiro, marcador, malas térmicas, termoacumuladores, luvas de latex, biogel, papel absorvente, equipamento de leitura de campo nomeadamente termómetro e fotómetro e um *tablet* considerado como relatório de colheita em suporte digital.

O controlo analítico da qualidade da água inicia-se com a colheita da amostra, devendo esta ser efetuada de acordo com o Procedimento Técnico, recolhida no

recipiente adequado, nas condições de preservação e transporte apropriadas até à sua análise no Laboratório.

Atendendo à diversidade de pontos de amostragem e objetivos de análise distintos, as metodologias de colheita de amostras de água são apresentadas seguidamente.

COLHEITA DE AMOSTRAS DE ÁGUA NO SISTEMA DE DISTRIBUIÇÃO (CO)

O procedimento de colheita de amostras de água de consumo não tratada considera as captações subterrâneas. A água de consumo tratada desde a ETA até à entrada das redes prediais considera como pontos representativos da distribuição os reservatórios e os pontos de entrega.

Antes de proceder à recolha das amostras, o Técnico verifica no local de colheita se as condições, nomeadamente, local, turvação e cheiro, conferem representatividade da água fornecida pela EG. Qualquer situação anómala deve ser tratada seguindo as orientações do responsável da EG. Seguidamente realiza-se o escoamento prévio de água estagnada no troço de conduta que serve o ponto de amostragem, abrindo a torneira selecionada e deixando escoar a água durante 5 a 10 segundos com fluxo máximo. Posteriormente, deve-se reduzir o fluxo e deixar correr a água o tempo suficiente para garantir a descarga da água estagnada. No caso de furos que tenham estado inativos durante algum tempo é conveniente, antes de efetuar a colheita, deixar correr livremente a água durante 15 a 20 minutos. Esta fase é avaliada pelo controlo da estabilidade da temperatura sendo aceite $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

Utilizando os frascos adequados, iniciar a recolha das amostras para os diferentes parâmetros físico-químicos e de seguida para os parâmetros radioativos. Efetua-se também no local a determinação do teor em cloro residual. Por último, efetuar a desinfecção da torneira e proceder à recolha das amostras para análise dos parâmetros microbiológicos desinfetando a torneira fechada, preferencialmente por flamejamento (chama de maçarico) ou, se não for possível (torneiras com boca/ terminação em plástico), limpar a boca da torneira com algodão embebido em álcool etílico a 70% e, de seguida, mergulhar a boca da torneira na solução desinfetante durante 2 a 3 minutos. Abrir a torneira, deixar escoar durante 5 a 10 segundos com fluxo máximo, reduzir o fluxo e deixar correr a água o tempo suficiente para eliminar a influência do desinfetante e da temperatura do flamejamento. Sem fechar a torneira e garantindo condições de assepsia, recolher a amostra em frasco estéril já com tiosulfato de sódio. Fechar imediatamente o frasco que não deve estar completamente cheio e agitar. Para evitar contaminações, garantir que as mãos estão limpas e desinfetadas

ou então são usadas luvas limpas ou descartáveis e só se deve abrir o frasco estéril pelo período de tempo estritamente necessário para a recolha da amostra.

Todos os frascos de colheita devem ser devidamente identificados, de modo a que sejam facilmente rastreáveis ao relatório de colheita.

Por último, colocam-se os frascos das amostras em malas térmicas devidamente limpas e com acumuladores de frio, de modo a garantir a correta refrigeração das amostras, e entrega-se as amostras no Laboratório o mais rapidamente possível. A quantidade de acumuladores de frio depende da quantidade de frascos em cada mala térmica, da duração do percurso até ao Laboratório e da temperatura ambiente.

COLHEITA DE AMOSTRAS DE ÁGUA NA TORNEIRA DO CONSUMIDOR (PCQA)

A verificação da conformidade da qualidade da água nos pontos de amostragem indicados no PCQA é realizada nas torneiras do consumidor.

Tal como para o CO, o Técnico valida as condições de representatividade da água no local. Tem ainda atenção eventuais situações que coloquem em causa a água fornecida, tais como roturas na rede ou misturas de água da rede pública com água de captações particulares. Confirma que a rede predial está a ser abastecida exclusivamente por água da rede pública e evita a escolha de torneiras localizadas no exterior de habitações, já que não são consideradas como normalmente utilizadas para o consumo humano podendo por isso estar ligadas a captações próprias. Preferencialmente deve-se escolher uma torneira de água fria. Deve-se retirar os acessórios externos e adaptados à torneira pelo consumidor.

Sem escoamento prévio, abrir a torneira e recolher o primeiro litro de água estagnada num frasco preparado especificamente para a análise dos parâmetros chumbo, cobre e níquel. De seguida, efetuar a desinfecção da torneira e proceder à recolha das amostras para análise dos parâmetros microbiológicos tal como realizado no CO. Logo após encher o frasco estéril e sem fechar a torneira, proceder à colheita das amostras para os frascos destinados à análise dos diferentes parâmetros físico-químicos e de seguida para os frascos dos parâmetros radioativos. O escoamento da água deve manter-se constante durante a colheita. No final destas colheitas encher o frasco para controlo da temperatura da mala de transporte. Por último, proceder à determinação no local, do teor de cloro residual e registar o valor obtido no relatório de colheita. O acondicionamento das amostras também é efetuado tal como no CO.

O transporte das amostras é efetuado por uma viatura do Laboratório e as amostras são entregues o mais rapidamente possível. O prazo de conservação é contabilizado desde o momento da colheita até o início da análise.

O Laboratório só realiza colheitas para curtos períodos de transporte, inferiores a 8 horas. Assim é suficiente garantir que a temperatura da amostra à chegada ao Laboratório não excede a temperatura original. Quando as amostras chegam ao Laboratório as malas térmicas são colocadas na sala de amostragem e as amostras são armazenadas no frigorífico. Caso se proceda imediatamente aos ensaios, as amostras são encaminhadas diretamente para os respetivos Laboratórios.

CONTROLO DE QUALIDADE NA AMOSTRAGEM PARA PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS

O controlo de qualidade na amostragem para parâmetros microbiológicos compreende o controlo da esterilidade dos frascos, a presença do agente inativante, ambos com frequência mínima de 1% recolhidos aleatoriamente. São também realizados brancos de campo e duplicados de colheita trimestralmente com critérios de aceitação definidos pelo Setor de Análises Microbiológicas.

O controlo da esterilização dos frascos é efetuado colocando aproximadamente 50ml de meio de cultura *Plate Count Agar* utilizando a técnica *Roll bottle* num frasco de colheita que posteriormente vai a incubar a $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante 5 dias. Em alternativa, na impossibilidade de utilizar esta técnica devem colocar-se nos frascos cerca de 100ml de uma solução de peptona salina a 1% e agitar aproximadamente durante um minuto. Seguidamente procede-se à sua filtração usando o sistema *Nalgen* ou *Microfil V*. Por fim, a membrana filtrante é colocada no meio de cultura *Nutrient Agar* que se incuba a $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante 7 dias. Não se deve verificar crescimento tanto nas membranas filtrantes como nos frascos.

A avaliação da presença do agente inativante nos frascos, é efetuada pela verificação do cloro residual em amostras (preferencialmente com valores elevados de teor de cloro residual tais como piscinas ou saída da ETA). Após a colheita é feita a determinação do cloro residual no frasco destinado à análise microbiológica correspondente ao lote que se quer avaliar.

Com a introdução da análise de brancos de campo pretende-se avaliar as condições de esterilidade de todo o processo analítico, averiguar a existência de contaminações durante a colheita e avaliar as condições de transporte das amostras. Dois recipientes (A e B1) são cheios com água destilada esterilizada. O recipiente A é retido no Laboratório, o recipiente B1 é transportado para o local de colheitas e é transvazado

para um recipiente B2 como se de uma amostra real se tratasse. As amostras A e B2 são ensaiadas simultaneamente no Laboratório.

A colheita de amostras em duplicado é uma técnica de controlo que visa controlar a precisão da colheita da amostra contaminada (ERSAR, 2017; ISO19458, 2006; ISO 5667-3, 2012; ISO 5667-5, 2006; ISO 11737, 2006; SMEWW, 2017).

4 *Clostridium perfringens*

A abordagem utilizada na vigilância e avaliação da qualidade microbiológica de água para consumo centra-se na pesquisa de microrganismos, normalmente presentes no intestino humano e de animais de sangue quente, tornando-se assim bio- indicadores de contaminação fecal.

A espécie *Clostridium perfringens* forma endósporos muito mais resistentes aos processos de tratamento quando comparados com as suas células vegetativas. Uma das análises microbiológicas mais importantes a efetuar são os sulfito redutores onde está incluído o género *Clostridium*. Os esporos deste género bacteriano como sobrevivem mais do que os coliformes onde se inclui a *Escherichia coli*, ou enterococos, podem ser utilizados como indicadores de poluição fecal remota e intermitente.

Esta bactéria, *C. perfringens* caracteriza-se por ser um bacilo *Gram* positivo, que produz colónias de cor negra a castanha amarelada em Triptose Sulfito Cicloserina (TSC) Agar após incubação anaeróbia a 44°C. É imóvel, reduz os nitratos a nitritos, fermenta a lactose, liquefaz a gelatina e possui a enzima fosfatase ácida.

Os processos de desinfecção no tratamento quer por cloragem até ao *Break Point*, quer por raios ultra violeta nem sempre são eficazes. O controlo de caudais, quantidade de matéria orgânica e turvação são determinantes para a eficiência do processo de desinfecção e consequentemente eliminação de *C. perfringens*. Um aumento da cloragem apresenta vantagens para a desinfecção contudo incrementa consideravelmente a formação de compostos tais como os trihalometanos. Estes últimos subprodutos resultantes da desinfecção têm confirmado serem potencialmente cancerígenos, revelando efeitos mutagénicos em diferentes espécies animais. Embora a resistência dos esporos de *C. perfringens* ofereça semelhanças com *Cryptosporidium* e *Giardia* eles não são indicadores confiáveis da presença desses parasitas na água para consumo humano (WHO, 1996; NHS, 2005; Geldreich, 1996).

5 O método atual (método interno)

O método que o Setor de Análises Microbiológicas utiliza atualmente permite a pesquisa e quantificação de *C. perfringens* na matriz de águas de consumo humano, tratadas e não tratadas recorrendo à técnica da membrana filtrante (NHS, 2005).

Esta técnica consiste em filtrar o volume de amostra ou das suas diluições e posteriormente colocar a membrana filtrante em TSC Agar com o quadriculado virado para cima.

As placas de Petri vão a incubar não invertidas em condições de anaerobiose, à temperatura de $(44\pm 1)^{\circ}\text{C}$ durante $(21\pm 3)\text{h}$.

Após incubação, procede-se à contagem das colónias presumíveis de *C. perfringens*. Contam-se todas as colónias que apresentem crescimento, mesmo que ligeiro no meio TSC Agar quando examinadas por cima ou por baixo da membrana.

5.1 Confirmação de *C. perfringens*

Para a confirmação do *C. perfringens* deve-se repicar um número representativo de cada tipo de colónias. Se a placa de Petri tiver entre 1 a 5ufc/ 100ml tem que se repicar todas as colónias. Para o caso de 6 a 100ufc/ 100ml deve-se repicar somente 6 colónias, para duas placas de Petri contendo meio gelose sangue sendo que uma placa é incubada em anaerobiose e a outra em aerobiose a $(36\pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante $(21\pm 3)\text{h}$.

Após incubação verificar a ausência ou presença de crescimento nas placas. Os testes de confirmação que se executam são a partir da placa que apresentou crescimento em anaerobiose. Desta, repicam-se as colónias para os seguintes meios de confirmação:

a) Meio tamponado de nitrato- mobilidade

Antes da sua utilização colocar o meio de confirmação durante 15 minutos num banho fervente seguido de arrefecimento. Inocular o meio por picada e incubar em anaerobiose a $(36\pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante $(21\pm 2)\text{h}$. Após incubação verificar se houve crescimento ao longo da estria. A mobilidade é visível pelo crescimento difuso.

Para verificar a presença de nitratos, adicionar a cada tubo de meio tamponado de nitratos um volume de 0,2 a 0,5ml de uma mistura de volumes iguais do reagente de nitrato A e B. A formação de uma cor vermelha confirma a presença de nitrito, produzido pela redução do nitrato em 15 minutos. Se não se desenvolver cor vermelha

adicionar pó de zinco e deixar repousar durante 10 minutos. Se se desenvolver cor vermelha não houve redução do nitrato e o teste é considerado negativo.

b) Meio lactose- gelatina

De igual forma, antes da sua utilização colocar o meio de confirmação durante 15 minutos num banho fervente seguido de arrefecimento. Inocular o meio e incubar em anaerobiose a $(36\pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante $(22\pm 2)\text{h}$. Após incubação observar a presença de gás e o desenvolvimento de coloração amarela indicadora de produção de ácido.

Arrefecer os tubos durante 2h a $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ e observar se houve liquefação da gelatina. Se o meio está sólido voltar a incubar a $(36\pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante $(21\pm 3)\text{h}$. Verificar novamente se houve liquefação da gelatina.

Esta bactéria, *C. perfringens* no meio TSC Agar produz colónias negras, é imóvel, reduz os nitratos a nitritos, produz ácido e gás a partir da lactose e liquefaz a gelatina em 48h. Os resultados são expressos em N/ 100ml.

Este método interno encontra-se na 4ª edição e está acreditado neste Laboratório desde 2010 com avaliações externas efetuadas pelo IPAC. Não foram identificadas até ao momento não conformidades e/ou oportunidades de melhoria apresentando também características de desempenho tanto ao nível do Controlo de Qualidade Interno (CQI) e do Controlo de Qualidade Externo (CQE) notáveis.

6 O método ISO a implementar

Este método permite a enumeração de *C. perfringens* (células vegetativas e esporos) nas águas utilizando a técnica da membrana filtrante. Aplica-se ao exame microbiológico de água de consumo tratada e não tratada, a menos que partículas em suspensão interfiram com a filtração ou que outros microrganismos em número elevado interfiram com o crescimento.

O *C. perfringens* presumível é uma bactéria que produz colónias de cor negra ou cinza a amarelo acastanhada em TSC Agar mesmo quando a cor é desmaiada após incubação anaeróbia a $(44\pm 1)^{\circ}\text{C}$ durante $(21\pm 3)\text{h}$. A cicloserina é um suplemento que se adiciona ao meio de cultura e que funciona como inibidor das espécies do género *Bacillus*. A incubação a $(44\pm 1)^{\circ}\text{C}$ durante $(21\pm 3)\text{h}$ aumenta a seletividade de *C. perfringens*, estando confirmada esta espécie quando produz colónias características em TSC Agar e tem presente a enzima fosfatase ácida.

Com a face voltada para cima coloca-se a membrana filtrante *Millipore S-PAK HAWG047S6* de 47mm com diâmetro de poro de 0,45µm, sobre o disco poroso segurando apenas no bordo exterior com o auxílio da pinça *Millipore* esterilizada de pontas planas. Coloca-se o copo esterilizado sobre a base do filtro conforme mostra a figura 7 (Sistema *Nalgene*) ou coloca-se o conjunto copo membrana e suporte (Sistema *Microfil V*) sobre a rampa.

Após filtração do volume de amostra ou das suas diluições, coloca-se a membrana em TSC Agar com o quadriculado virado para cima certificando que não fica ar por baixo da membrana.

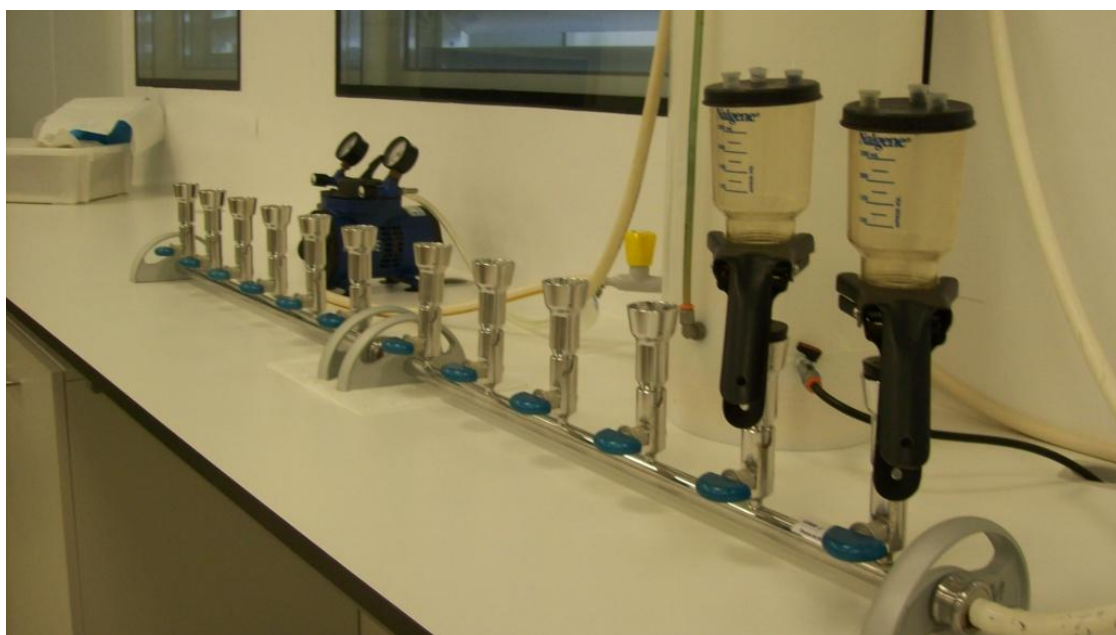


FIGURA 7 - FILTRAÇÃO PELO SISTEMA NALGENE

O tempo entre o final da filtração e o início da incubação deve ser o mais reduzido possível e não deve exceder 1h. Incubam-se as placas invertidas para evitar interferências com os condensados em condições de anaerobiose, à temperatura de $(44\pm 1)^{\circ}\text{C}$ durante $(21\pm 3)\text{h}$.

A anaerobiose é realizada nas jarras da *Oxoid Anaerojar 2,5l* (figura 8). Este sistema garante pelo menos uma atmosfera de 90% de hidrogénio e 10% de dióxido de carbono. Verificar a eficácia das condições de anaerobiose recorrendo ao gerador de anaerobiose *Oxoid AN0025A*, indicador químico de anaerobiose *Oxoid BR0055* e controlo microbiológico positivo e negativo (*C. perfringens* World Data Center for Microorganisms (WDCM) 00007 como controlo positivo e *Bacillus subtilis* WDCM

00003 como controlo negativo). Estes registos são efetuados no impresso que o Laboratório já utiliza para o método interno.



FIGURA 8- INCUBAÇÃO A 44°C EM ANAEROJAR

Após incubação procede-se à contagem das colónias presumíveis de *C. perfringens*. Contam-se todas as colónias que apresentem crescimento de cor preta ou cinzenta a amarela acastanhada, mesmo que esbatidas no meio TSC Agar quando examinadas por cima ou por baixo da membrana. Uma vez que as colónias pretas desvanecem rapidamente acabando por desaparecer as placas devem ser observadas 30 minutos após retiradas da estufa. Se são utilizadas mais do que uma jarra de anaerobiose as placas são observadas jarra a jarra.

O registo das contagens é efetuado nos *templates* do *LabWay-LIMS*. Este programa representa a solução digital global do Laboratório sendo categórico na implementação do processo de acreditação, na organização interna e na resposta às crescentes exigências dos clientes, permitindo informatizar todas as áreas desde a programação de atividades, gestão das amostras, distribuição de trabalho, introdução de resultados, emissão de relatórios de ensaio, orçamentação e faturação, controlo da qualidade, e publicitação de resultados.

A monitorização da temperatura de incubação é garantida pela existência do sistema *Labguard* (figura 9). Este sistema sendo calibrável e sem fios permite a monitorização em contínuo do parâmetro temperatura 24 horas por dia, 7 dias por semana, tendo como maior vantagem a existência de alertas em tempo real para intervenção imediata. Evitam-se desta forma constatações de evidência e futuras não conformidades com consequente rejeição de trabalho.



FIGURA 9- LABGUARD

Para a confirmação do *C. perfringens* (figura 10) deve-se executar uma subcultura de todas as colónias de 1 até 10ufc/ 100ml e pelo menos 10ufc/ 100ml para contagens superiores, retirando aleatoriamente para placas de gelose de sangue. Seguidamente incubar em anaerobiose a $(36\pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante $(21\pm 3)\text{h}$.

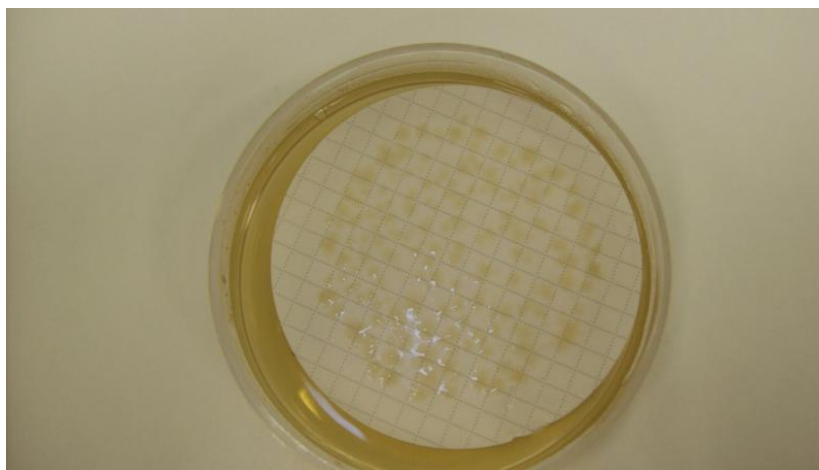


FIGURA 10- COLÓNIAS DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* PRESUMÍVEIS EM TSC AGAR

As colónias que crescerem em anaerobiose serão espalhadas em papel de filtro sendo posteriormente colocadas 2 a 3 gotas do reagente para detetar a fosfatase. O aparecimento de uma cor púrpura ao fim de 3 a 4 minutos é considerado como reação positiva. Aquando do teste da fosfatase ácida, efetuar um controlo positivo com *C. perfringens* WDCM 00007 e um controlo negativo com *Clostridium bifermentans* WDCM 00079 conforme mostra a figura 11.

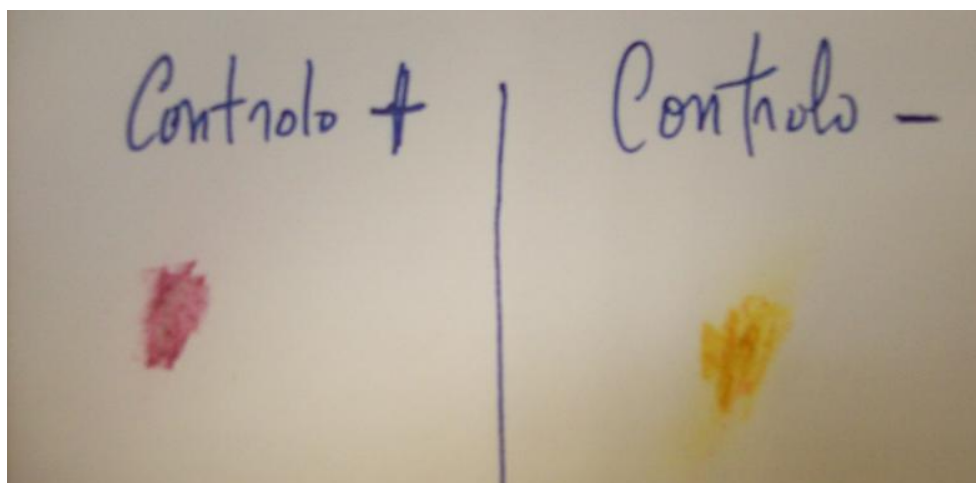


FIGURA 11- CONTROLO POSITIVO E CONTROLO NEGATIVO AO TESTE DA FOSFATASE

O *C. perfringens* no meio TSC Agar produz colónias pretas ou cinzentas a amarelas acastanhadas e possuem fosfatase ácida. A figura 12 mostra três resultados do teste da fosfatase ácida realizado a três colónias de uma amostra com resultado positivo. Por fim, calcula-se o número total de *C. perfringens* por 100ml a partir dos *C. perfringens* presumíveis e confirmados.

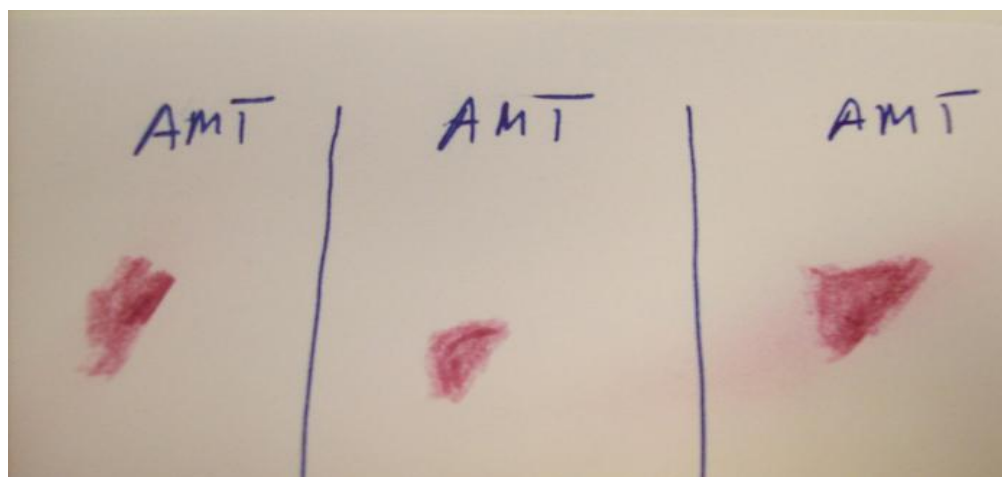


FIGURA 12- AMOSTRAS DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* FOSFATASE POSITIVAS

LEGENDA: AMT- AMOSTRA

6.1 Levantamento de necessidades do método ISO a implementar

Da interpretação da Norma ISO e atendendo ao que já existe no Laboratório por força do método implementado é necessário adquirir e prever o seguinte:

- Programar uma Auditoria Interna, a efetuar por um Auditor externo e que pertença à bolsa de Auditores do IPAC.

- Ao nível do CQE, realização do ensaio de aptidão *LGC Standards- Quality in Water Analysis Scheme* da amostra *413 Potable Water*.
- Adquirir a estirpe WDCM 00003 de *B. subtilis* para evidência de controlo negativo das condições de anaerobiose e seletividade do meio primário TSC Agar.
- Adquirir a estirpe WDCM 00079 de *C. bifermentans* para evidência de controlo negativo do teste da fosfatase.
- Luvas de nitrilo compridas tamanhos S e L.
- Sistema de filtração para utilizar na preparação do reagente da fosfatase composto por seringa *BBraun Omnifix* referência 4617207V e filtro para seringa de acetato de celulose com diâmetro de poro de 0,45µm da *Frilabo*.
- Solução tampão de acetato a pH 4,6±0,2 *Chemical Abstracts Service* (CAS) 126-96-5.
- 1- naftilfosfato fosfato CAS 2183-17-7.
- *Fast Blue B* sal CAS- 14263-94-6.

No que diz respeito às estirpes WDCM e demais reagentes a adquirir, exigir as respetivas fichas de segurança e certificados de qualidade.

6.2 Pessoal

Além das habilitações mínimas descritas no Manual da Qualidade o pessoal necessita de formação específica para ser considerado qualificado para a execução do ensaio. Esta formação foi assegurada pelo Responsável Técnico e teve especial foco para as questões de segurança da preparação, utilização e descarte do *Fast Blue B* sal.

Uma vez que a preparação do reagente e a utilização do mesmo é realizada no Setor de Análises Físico-Químicas, a Responsável Técnica ministrou uma ação de formação interna relativa à utilização das *hottes* e da balança.

Na implementação do método, os Técnicos que acompanhem o Responsável Técnico são qualificados inicialmente apenas pela execução dos ensaios. Caso contrário devem ser efetuados cinco duplicados por parâmetro quando os resultados forem inferiores ao Critério de Precisão (CP), participação em pelo menos um Ensaio Interlaboratorial (EIL) com bom desempenho sempre que possível e utilização de três Materiais de Referência (MR) por parâmetro nas cartas de controlo com bom desempenho.

Depois de qualificado o pessoal tecnicamente o Responsável Técnico atualiza a matriz de qualificação (figura 13).

smas MUNICÍPIO DE LEIRIA		MATRIZ DE QUALIFICAÇÃO									
Sector: <u>Análises Microbiológicas</u>											
Ensaio/Actividade	Técnico										
	A*	B ^{RS}	C	D	E	F	G				
1) Limpeza e manutenção do Laboratório	+	+	+	++	++	++	++				
2) Preparação e esterilização do material	+	+	+	++	++	++	++				
3) Preparação de meios de cultura	+	+	+	++	++	++	++				
4) Filtrações	++	++	+	++	++	++	-				
5) Incorporações	++	++	+	++	++	++	-				
6) Leituras e repicagens	++	++	+	-	-	-	-				
7) Utilização de MR	++	++	+	-	-	-	-				
8) EIL's	++	++	+	+	+	+	-				

* Responsável Técnico ^{RS}RT Substituto ++ Está qualificado e executa em rotina + Está qualificado +- Executa sob supervisão - Não qualificado

Data dd-mm-aaaa RT: _____

OBSERVAÇÃO: As AO's não executam ensaios na Gama Alta

MOD. G 32

Página 1 de 1

Rev 01
07/09/2010

FIGURA 13- MATRIZ DE QUALIFICAÇÃO

LEGENDA: MR- MATERIAL DE REFERÊNCIA; EIL- ENSAIO INTERLABORATORIAL

6.3 Equipamento

A calibração e a manutenção externas do equipamento a utilizar foi efetuada por entidades competentes conforme definido no plano e aprovado pelo Conselho de Administração. Após calibração do equipamento, foi avaliado o correspondente certificado de calibração, no sentido de verificar que os desvios determinados são compatíveis com os Erros Máximos Admissíveis (EMA) definidos e consequentemente a qualidade dos resultados que se pretendem obter (RELACRE, 2007).

- Manutenção externa da Câmara de Segurança Biológica (CSB)- equipamento M14 da marca Faster- modelo BH-EN2006D

Foi realizado o ensaio de penetração ao filtro *High Efficiency Particulate Arrestance* (HEPA) "*Leak Test*" com o objetivo de verificar se existem fugas nos filtros absolutos HEPA e respetiva estrutura, sendo o resultado conforme no filtro de ar descendente e no filtro de exaustão. O ensaio de ruído tem como objetivo a medição do nível de ruído emitido pelo equipamento. Sem correção apresentou 62dB(A) o que se considera conforme pois é inferior a 70dB(A). O ensaio da iluminância tem por objetivo a

medição da intensidade luminosa no centro da bancada com a luz da câmara ligada e desligada. Com a luz desligada a iluminância foi de 123lux para um critério de aceitação $<160\text{lux}$ e 1514lux para um critério de aceitação $\geq 480\text{lux}$, sendo o resultado considerado conforme. O ensaio de fumos ao comportamento do fluxo de ar tem por objetivo colocar fumo em diversos pontos, de forma a observar o comportamento do fluxo de ar. O ensaio está conforme pois não se constataram pontos mortos ou refluxos. Finalmente foi efetuado o ensaio da velocidade do ar à entrada. O resultado obtido foi de 0,44m/s para um critério de aceitação $>0,38\text{m/s}$ sendo portanto considerado conforme. A apreciação final mostra que se pode utilizar a câmara de segurança biológica sem restrições (ISO 7218, 2007; Faster, 2005).

- Calibração externa da Balança- equipamento M04 da marca Precisa modelo-XR405A-FR

Foi realizado o ensaio prévio que serve para estimar a degradação e estabilidade da balança desde a última calibração. Este ensaio consiste na diferença entre o valor de referência do padrão de 100g e o valor encontrado no ensaio que foi de 99,9997g. O resultado desta diferença é 0,0003g. O ensaio prévio cumpre o requisito de ser $<1\%$ (1g). Seguidamente foi realizado o ensaio de excentricidade.

O ensaio de excentricidade, consiste em colocar primeiro um peso-padrão no centro do prato, a cerca de 1/3 do alcance máximo do instrumento de pesagem, e repetir o ensaio noutras 4 posições distintas do prato da balança, na sua zona mais externa, de forma a avaliar a influência deste parâmetro na medição. Da avaliação do certificado evidencia-se que o erro máximo de excentricidade que corresponde a 0,000g cumpre o requisito de ser $<EMA$ da balança de 1%, ou seja, 1,5g à carga nominal de 150g.

Finalmente e relativamente ao ensaio de exatidão foram efetuadas pesagens para 1, 20, 50, 70, 100 e 300g. A avaliação do ensaio consistiu na interpretação do seguinte critério: $|\text{erro} + \text{incerteza}| < EMA1\%$.

Da análise da tabela 2, conclui-se que se pode utilizar a balança sem restrições em toda a gama de trabalho (ISO11133, 2014; Precisa, 2005).

TABELA 2- BALANÇA ENSAIO DE EXATIDÃO

Ensaio (g)	erro (g) + incerteza (g) <EMA (g) 1%	Resultado (g)	Decisão
1	0,0000+ 0,00007 <0,01	0,00007	Aceite
20	0,0002+ 0,00012 <0,2	0,00032	Aceite
50	0,0002+ 0,00014 <0,5	0,00034	Aceite
70	0,0000+ 0,00007 <0,01	0,00007	Aceite
100	0,0002+ 0,00018 <1	0,00038	Aceite
300	-0,00g+ 0,0008 <3	0,0002	Aceite

LEGENDA: EMA- ERRO MÁXIMO ADMISSÍVEL

- Calibração externa da Autoclave- equipamento M03 da marca AJC modelo- Uniclave 88

O critério de aceitação definido para a temperatura é de $(121^{\circ}\text{C} \pm 3)^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. O histórico de anos anteriores mostra que a regulação no equipamento é de 124°C . Este ensaio foi realizado com cargas de 250, 500 e 1000ml de água referentes a 6 sondas cada. A temperatura foi avaliada pelo critério | máximo do máximo+ incerteza | < 124°C com $| 121,17^{\circ}\text{C} + 0,40^{\circ}\text{C} | < 124^{\circ}\text{C}$ e | mínimo do mínimo- incerteza | > 118°C com $| 119,63^{\circ}\text{C} - 0,40^{\circ}\text{C} | > 118^{\circ}\text{C}$. Logo $121,57^{\circ}\text{C} < 124^{\circ}\text{C}$ e $119,23^{\circ}\text{C} > 118^{\circ}\text{C}$, ambos foram aceites. A avaliação gráfica do certificado referente à pressão mostra que não há variação da pressão ao longo do tempo. Para garantir o tempo preconizado de 15 minutos, é necessário regular o tempo para 20, 25 e 30 minutos para os frascos de 250, 500 e 1000ml respetivamente. Desta avaliação resultaram autoclavagens de volumes separados com uma regulação de 124°C sem restrições (ISO 7218, 2007; ISO 11133, 2014; AJC, 2009).

- Calibração externa do Banho Maria- equipamento M06 da marca Memmert modelo- WNE10

O critério de aceitação definido para a temperatura do banho é de $(45 \pm 1)^{\circ}\text{C}$. O histórico de anos anteriores mostra que a regulação no equipamento é de 45°C . A temperatura foi avaliada pelo critério | máximo do máximo+ incerteza | < 46°C com $| 45,58^{\circ}\text{C} + 0,19^{\circ}\text{C} | < 46^{\circ}\text{C}$ e | mínimo do mínimo- incerteza | > 44°C com $| 45,28^{\circ}\text{C} -$

0,19°C | > 44°C. Deste modo foram obtidos os valores de 45,77°C < 46°C e 45,09°C > 44°C, por isso foram ambos aceites. Como conclusão, para 45°C e com regulação de 45°C pode-se utilizar o banho sem restrições (ISO 7218, 2007).

- Calibração externa da Estufa de 36°C- equipamento M18 da marca Binder modelo- BD118

O critério de aceitação definido para a temperatura da estufa é de (36°C±2)°C. O histórico de anos anteriores mostra que a regulação no equipamento é de 36°C. A temperatura foi avaliada pelo critério | máximo do máximo+ incerteza | < 38°C com | 35,59°C+ 0,19°C | < 38°C e | mínimo do mínimo- incerteza | > 34°C com | 35,38°C- 0,19°C | > 34°C. Deste modo os valores de temperatura obtidos de 35,78°C < 38°C e de 35,19°C > 34°C, foram ambos aceites. Resumindo, para 36°C e com regulação de 36°C pode-se utilizar a estufa sem restrições (SMEWW, 2017; ISO 7218, 2007).

- Calibração externa da estufa de 44°C- equipamento M20 da marca Binder modelo- BD118

O critério de aceitação definido para a temperatura da estufa é de (44±0,5)°C e não (44±1)°C como definido na Norma uma vez que esta estufa também é utilizada para a confirmação da *E. coli*. O histórico de anos anteriores mostrou que a regulação no equipamento é de 45,4°C. A temperatura foi avaliada pelo critério | máximo do máximo+ incerteza | < 44,5°C com | 44,29°C+ 0,19°C | < 44,5°C e | mínimo do mínimo- incerteza | > 43,5°C com | 43,74°C- 0,19°C | > 43,5°C. Deste modo, como 44,48°C < 44,5°C e 43,55°C > 43,5°C, foram ambos aceites. Concluindo, para 44°C e com regulação de 45,4°C pode-se utilizar a estufa sem restrições (SMEWW, 2017; ISO 7218, 2007).

6.4 Análise à qualidade do ar e às superfícies

Com este procedimento pretendeu-se avaliar a qualidade do ar e das superfícies existentes no Laboratório de Microbiologia perante um valor limite (VL) de carga máxima microbiana existente. Estas análises aplicaram-se às salas de meios de cultura, filtrações e incorporações e leituras e repicagens. Este ensaio subdividiu-se e seguiu o seguinte procedimento.

Para avaliar a qualidade do ar foram colocadas em exposição ao ar placas de Petri para controlo microbiológico. No que diz respeito à análise das superfícies, foram utilizadas placas de contacto para controlar potenciais contaminações microbiológicas.

O equipamento utilizado nesta fase contou com uma estufa de incubação regulável a $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$ e um contador de colónias. Como consumíveis foram utilizados os meios de cultura *Nutrient Agar- Oxoid* e Placas *Rodac* contendo *Tryptic Soy Agar* (TSA) (251114TI) da *Merck*, assim como placas de Petri de diâmetro de 90mm.

Para a análise ambiental foram controladas semanalmente as bancadas das salas de filtrações/ incorporações, preparação de meios de cultura e no interior das CSB. No que se refere às superfícies, os locais de análise foram as bancadas de filtrações/ incorporações e as bancadas de preparação dos meios de cultura. A frequência também foi semanal.

6.4.1 Técnica a utilizar

No que diz respeito à análise ambiental, abriu-se a placa de Petri ($\varnothing 90\text{mm}$) contendo *Nutrient Agar* sobre a bancada de trabalho, durante 15 minutos. No caso das CSB este procedimento realizou-se após estabilização do fluxo laminar. Em ambos casos não se podia estar a trabalhar em simultâneo com o decorrer desta análise. Finalmente incubou-se a $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante $(68\pm 4)\text{h}$.

Relativamente à análise de superfícies destapou-se a placa de contacto e pressionou-se uniformemente com um peso a parte convexa durante aproximadamente 10 segundos sobre a superfície da bancada de trabalho e após desinfeção com *DDN SURF* a 5% (*Franklab*). Seguidamente efectuou-se a incubação a $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante $(68\pm 4)\text{h}$. No final limpou-se a superfície utilizada para remover quaisquer resquícios de Agar.

6.4.2 Análise dos resultados

Terminadas as incubações, procedeu-se à análise dos resultados obtidos atendendo aos VL estabelecidos no Procedimento Auxiliar de Microbiologia e que se apresentam seguidamente:

- ⇒ Análise ambiental- $\text{VL}_{\text{máximo}}$ - 15ufc/ placa de Petri.
- ⇒ Análise ambiental CSB meios $\text{VL}_{\text{máximo}}$ - 0ufc/ placa de Petri.
- ⇒ Análise ambiental CSB repicagens $\text{VL}_{\text{máximo}}$ - 0ufc/ placa de Petri.
- ⇒ Análise de superfícies- $\text{VL}_{\text{máximo}}$ - 5ufc/ placa de Petri.

A tabela 3, mostra os resultados obtidos semanalmente durante os 2 meses das

análises efetuadas ao ar e às superfícies do Laboratório. Da interpretação dos resultados obtidos na tabela verificou-se que estes se encontram inferiores ao VL. No caso de os resultados serem superiores ao VL, deve-se acionar o plano de limpeza. Posteriormente deve-se medir a eficácia do plano, executando nova análise (SMEWW, 2017; ISO 7218, 2007).

TABELA 3- RESULTADOS DA ANÁLISE AO AR E ÀS SUPERFÍCIES (ufc/ PLACA DE PETRI)

Semana	CSB Meios ufc/ placa Petri	CSB Repicagens ufc/ placa Petri	Sala Filtração ufc/ placa Petri		Sala Meios ufc/ placa Petri		Decisão
			Ambiente	Superfícies	Ambiente	Superfícies	
Semana 1	0	0	1	0	0	0	Conforme
Semana 2	0	0	2	0	3	0	Conforme
Semana 3	0	0	0	0	0	1	Conforme
Semana 4	0	0	1	0	1	0	Conforme
Semana 5	0	0	3	0	0	0	Conforme
Semana 6	0	0	4	0	0	0	Conforme
Semana 7	0	0	2	0	1	0	Conforme
Semana 8	0	0	2	0	2	2	Conforme

6.4.3 Descontaminação

O material que tenha estado em contacto com meios de cultura usados ou com culturas de microrganismos durante as manipulações, foi esterilizado na autoclave de sujos a $(130\pm 5)^{\circ}\text{C}/30$ minutos sendo a sua eficácia comprovada em cada ciclo com o sistema *Labguard*, indicador biológico *Sterikon plus bioindicator* e controlador químico. Por dia de descontaminação foi também utilizado um controlo positivo que funcionou como testemunho.

O indicador biológico foi incubado a $(60\pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 48h. Após incubação manteve a cor violeta. Se apresentar a cor amarela, a descontaminação

não será eficaz devendo por isso ser repetida. O material descontaminado só se colocou no contentor depois de se conhecer o resultado do indicador biológico.

Após esterilização, retirou-se o saco que se colocou no contentor, pois este resíduo descontaminado é equiparado a resíduo doméstico.

Por forma a evitar entupimento do esgoto realizaram-se após as descontaminações ensaios em branco (ISO 7218, 2007).

6.5 Receção, preparação e controlo dos meios de cultura e reagentes

O presente procedimento descreve os critérios para a preparação e controlo dos meios de cultura e reagentes utilizados na implementação do método (ISO 11133, 2014).

De seguida é apresentada a terminologia usada neste procedimento.

a) Lote interno de meio de cultura

Este meio de cultura é produzido a partir de um lote de meio de cultura desidratado que requer tratamento e re-hidratação antes da utilização, conforme indicação do fabricante e originando ou um meio completo ou um meio incompleto a que são adicionados suplementos antes da utilização.

b) Performance do meio de cultura

Comportamento do meio de cultura quando confrontado com microrganismos sob condições definidas.

c) Meio de cultura

Formulação de substâncias na forma líquida, semi- sólida ou sólida, contendo constituintes naturais ou sintéticos com o objetivo de favorecer a multiplicação ou para preservar a multiplicação dos microrganismos.

d) Microrganismo alvo

Microrganismo ou grupo de microrganismos a detetar ou enumerar.

e) Microrganismo não alvo

Microrganismo que não cresce e/ou cresce sem apresentar as características específicas ou esperadas nesse meio de cultura.

f) Produtividade

Recuperação de um microrganismo alvo num meio de cultura.

g) Seletividade

Decréscimo da inibição ou mesmo total inibição de crescimento de um microrganismo não alvo num meio de cultura.

h) Controlo positivo

Estirpes que apresentam num meio de cultura crescimento com as características esperadas.

i) Controlo negativo

Estirpes que demonstram total inibição de crescimento num meio de cultura.

6.5.1 Receção dos meios de cultura e reagentes

Em virtude do meio de cultura a utilizar ser o mesmo do método interno foi verificada a conformidade da *check list* do Laboratório aquando da sua receção.

O Laboratório seguiu as instruções do fornecedor sobre condições de armazenamento, validade e utilização. A utilização de meios de cultura e reagentes após validade não são permitidas. Os meios são adquiridos aos fabricantes por intermédio dos fornecedores qualificados. São entregues em pó desidratado ou granulado em embalagens seladas. Os suplementos são fornecidos na forma liofilizada.

Os meios prontos a utilizar seguem as instruções do fabricante considerando as condições de armazenagem, a data de validade e utilização. O controlo de qualidade é realizado indiretamente durante o processo analítico.

6.5.2 Preparação do meio de cultura

A exatidão da preparação do meio de cultura é um dos passos fundamentais na análise microbiológica. Devem ser respeitadas as Boas Práticas de Laboratórios (BPL) e as instruções dos fabricantes, no que diz respeito à manipulação dos meios desidratados e outros componentes. De igual forma, a preparação dos meios desidratados a partir de formulações comerciais deve obedecer exatamente às instruções do fabricante.

Deverá registrar-se toda a informação relevante nomeadamente, peso, volume, data de preparação, condições de esterilização e Técnico responsável pela preparação do meio de cultura.

a) Água

Para preparar os meios de cultura, reagentes e soluções de diluição utiliza-se a água tratada disponível em rede devendo apresentar as especificações apresentadas na tabela 4.

TABELA 4- ESPECIFICAÇÕES PARA A QUALIDADE DA ÁGUA

Ensaio	Frequência/ Monitorização	Limite Máximo Aceitável
Condutividade	Continuamente ou em cada utilização	<5 $\mu\text{S/cm}$ (leitura no equipamento)
Número de colónias a 22°C/(68±4)h	Mensalmente	<100 ufc/ml

Foram consultados os registos internos referentes à qualidade da água utilizada e verificou-se que estavam conforme relativamente aos limites máximos aceitáveis.

b) Pesagem e re-hidratação

Cuidadosamente, pesar a quantidade do meio desidratado sendo que o EMA é de 1%. Ter cuidado para não inalar o pó, especialmente com meios que contêm substâncias tóxicas e progressivamente adicionar à água evitando a formação de grumos.

c) Dissolução e dispersão

Os meios desidratados, necessitam de uma rápida dispersão mediante agitação e aquecimento se necessário para facilitar a dissolução. Os meios que contêm agar devem repousar alguns minutos antes do aquecimento.

d) Medição do valor de pH

O valor de pH dos meios de cultura deve-se encontrar entre $\pm 0,2$ unidades. Verifica-se com os meios já esterilizados, após a sua solidificação e à temperatura ambiente. Não

se efetuam correções ao valor de pH obtido nos meios de cultura que têm origem em formulações comerciais desidratadas.

e) Distribuição

A distribuição dos meios segue a tabela 5 de especificações para distribuição de meios.

TABELA 5- ESPECIFICAÇÕES PARA A DISTRIBUIÇÃO DOS MEIOS

Meio de Cultura	Referência/Marca	Peso pH	Suplementos	Distribuição
TSC Agar	BioKar/ BK031ha	42g/l 7,6±0,2	D cicloserina 1ml/ 100ml TSC Agar BioKar BS608	Frascos 250ml sem suplemento Placas de Petri Φ 55mm com suplemento

f) Esterilização

A esterilização de meios de cultura é levada a cabo por calor húmido. A esterilização por calor húmido é efetuada na autoclave. A autoclavagem é feita a $(121\pm3)^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos.

A performance da autoclavagem é monitorizada usando uma fita de controlo que sob determinadas características muda de cor, o sistema *Labguard* e um bioindicador que é incubado a $(60\pm2)^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 48h. Após autoclavagem os meios foram monitorizados em particular atendendo ao valor de pH, cor e esterilidade.

Foi realizado um controlo de resistência sobre uma placa de Petri previamente seca, com a ajuda de uma ansa.

g) Preparação para utilização

Fundir os meios de cultura colocando-os num banho de água fervente ou na autoclave (aproximadamente $110^{\circ}\text{C}/15$ minutos). A utilização do microondas não é recomendada em qualquer circunstância.

O meio que foi previamente autoclavado deve ser reaquecido por um tempo mínimo para manter a sua qualidade.

Evitar o sobreaquecimento e retirar quando está fundido. Arrefecer o meio fundido a $(45^{\circ}\text{C} \pm 1)^{\circ}\text{C}$. O tempo necessário para alcançar os 45°C depende do tipo de meio, do volume e do número de unidades no banho. Por isso, o meio fundido deve ser utilizado logo que possível mas é recomendado que não deve ser usado antes de 1h e não mais que 4h.

h) Adição de suplementos

Os suplementos sensíveis ao calor devem ser adicionados ao meio após o arrefecimento a $(45 \pm 1)^{\circ}\text{C}$. Fazer com que o suplemento estéril tenha a temperatura ambiente antes de o adicionar ao meio de agar. Líquidos frios podem originar formas transparentes do agar. Homogeneizar todos os suplementos suavemente no meio, depois distribuir em recipientes finais o mais rápido possível.

i) Preparação e armazenagem dos meios

Para os meios armazenados em frascos e tubos considera-se três meses como o tempo máximo de vida útil. Colocar o meio fundido em placas de Petri obtendo pelo menos uma altura de 3mm. Permitir que o agar arrefeça e solidifique colocando as placas de Petri em local fresco numa superfície horizontal.

Utilizar o meio solidificado imediatamente ou armazenar em condições que previnam a sua modificação isto é, em local escuro e/ ou refrigerado de 2°C a 8°C $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ em caixas fechadas num período máximo de um mês. Etiquetar as caixas com a identificação do Técnico, data de preparação, validade e lote interno.

No entanto, podem-se utilizar os meios de cultura e reagentes após validade se os testes de controlo de qualidade efetuados estiverem conformes. Antes de utilizar, o meio de cultura é equilibrado à temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos na CSB (ISO 11133, 2014).

6.5.3 Controlo de qualidade do produto final

a) Controlo de qualidade físico

Os testes laboratoriais incluem, a medição do valor de pH à temperatura ambiente, quantificação do volume, cor, presença de artefactos e estabilidade do gel/ consistência.

b) Controlo de qualidade microbiológico

É realizado por lote interno e frasco uma prova de esterilidade para verificar ausência de contaminação sendo que os lotes devem ser testados de acordo com o método em questão.

c) Microrganismos de teste

Devem-se utilizar estirpes de controlo positivo e estirpes de controlo negativo. O controlo positivo/ negativo é efetuado com MR WDCM sendo que as respetivas incubações são realizadas de acordo com o método em questão.

No caso do TSC Agar para o controlo positivo foi utilizado o *C. perfringens* e para o controlo negativo o *B. subtilis*.

d) Produtividade

Este ensaio, realiza-se sempre que se prepara um lote interno de meio de cultura. Inocular ao meio em questão e ao meio não seletivo, o volume de uma lentícula ou equivalente dividida em partes iguais do microrganismo alvo.

Deve considerar-se 80 a 120ufc por placa de Petri como valor mínimo indicativo a obter. A recuperação do microrganismo alvo é \geq que 0,70 do resultado obtido no meio de cultura não seletivo. Considerou-se como meio de referência o Columbia a 5% sangue de carneiro com a referência MP20.1276 pronto a utilizar adquirido à Biogerm.

Como o microrganismo alvo considerado foi o *C. perfringens* considera-se a Produtividade $= (Ns/ N0) \geq 0,70$ em que Ns representa o total de colónias obtidas no meio de cultura a testar e N0 o total de colónias obtidas no meio de cultura de referência.

e) Seletividade

Este ensaio é efetuado sempre que se prepara um lote interno de meio de cultura. O ensaio da seletividade consiste na inoculação de um MR WDCM (inóculo de 10^4 a 10^6 ufc) de um microrganismo não alvo num meio de cultura seletivo e num meio de cultura não seletivo.

Quando o critério de seletividade é inibição total de crescimento, este ensaio é considerado como controlo negativo sendo executado de uma forma qualitativa, o que se pretende para a implementar este método.

A tabela 6 mostra a conformidade de preparação e controlo do Lote interno 94 de TSC Agar ao longo das 8 semanas de utilização (ISO 11133, 2014).

TABELA 6- REGISTO DE PREPARAÇÃO DO LOTE INTERNO 94 DE TSC AGAR

MEIO DE CULTURA	TÉCNICO	DATA	VALIDADE	Peso/ Volume água
TSC Agar L94-14D494A	A	S1	S1+3meses	86,1g/2050ml
				Conformidade da água
				Conforme
Distribuição	8 frascos de 250ml		1 frasco de 50ml	
Controlo da Esterilização			Bioindicador	Indicador químico
			Conforme	Conforme
Adição de suplementos	D cicloserina Lot 0009837			
	2,5ml; Água lote interno 14			
	S1; S2; S3; S4; S5; S6; S7; S8			
pH		7,5	Resistência	Presença de artefactos
			Conforme	Conforme
Controlo positivo			C. perfringens	Conforme
Controlo negativo			B. subtilis	Conforme
Seletividade	B. subtilis			Produtividade= (Ns/N0)
	Total inibição			
				(92ufc/95ufc)=0,96
Esterilidade	S1; S2; S3; S4; S5; S6; S7 e S8- todos os resultados foram de 0ufc/ placa de Petri			

LEGENDA: S1, S2.....S8- SEMANAS; Ns- TOTAL DE COLÓNIAS OBTIDAS NO MEIO DE CULTURA A TESTAR; N0- TOTAL DE COLÓNIAS OBTIDAS NO MEIO DE CULTURA DE REFERÊNCIA

6.5.4 Preparação do reagente para o teste da fosfatase ácida

Preparar o tampão de acetato dissolvendo 0,3ml ácido acético glacial (CAS-64-19-7) e 0,4g de acetato de sódio (CAS 127-09-3) em água desionizada e perfazer até 1000ml. Em alternativa utilizar o produto comercial disponível.

Dissolver os ingredientes no tampão de acetato e deixar repousar durante (60 ± 5) min a $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ para permitir a precipitação.

Remover o precipitado filtrando a solução por um sistema composto de seringa *BBraun Omnifix* e filtro para seringa de acetato de celulose com diâmetro de poro de $0,45\mu\text{m}$ conforme mostra a figura 14. Armazenar a solução preparada a $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ não mais que duas semanas. Se ocorrer novamente precipitação filtrar novamente antes de utilizar.



FIGURA14- FILTRAÇÃO DO REAGENTE DA FOSFATASE

Durante a manipulação do sal *Fast Blue B* deve-se ter o máximo de cuidado pois este reagente é altamente tóxico, sendo potencialmente cancerígeno.

Entretanto, foi necessário o desenvolver um MOD que a tabela 7 mostra em forma de registo para a preparação do reagente para o teste da fosfatase ácida sendo este utilizado nas semanas S1, S3, S5 e S7 (ISO 11133, 2014; ISO 14189, 2013).

TABELA 7- REGISTO DE PREPARAÇÃO DO REAGENTE DO TESTE DA FOSFATASE ÁCIDA

Lote	Data	Responsável	Tampão acetato 1l		0,4g 1-naftil disódico Lote	0,8g Fast Blue B Sal Lote
			0,3ml Ácido acético glacial Lote	0,4g Acetato sódio Lote		
L1	S1	A	0000905187	00000881299	Xu3va	Mkbw8469v
L2	S3	B	0000905187	00000881299	Xu3va	Mkbw8469v
L3	S5	A	0000905187	00000881299	Xu3va	Mkbw8469v
L4	S7	C	0000905187	00000881299	Xu3va	Mkbw8469v
Atenção Solução final a utilizar do tampão acetato 20ml+ 1-naftil disódico+ Fast Blue B Sal						

LEGENDA: L1, L2...L4- LOTE DO REAGENTE; S1, S3, S5, S7- SEMANAS

6.6 Controlo de qualidade na utilização do método

O controlo de qualidade na utilização do método está dividido em CQI e CQE.

6.6.1 Controlo de qualidade interno (CQI)

a) Materiais de referência

São utilizadas estirpes WDCM (figura 15) no controlo positivo qualitativo de processo (acompanhamento das fases de confirmação) e quantitativo com respetiva carta guia. São também utilizadas no processo de qualificação de pessoal.



FIGURA15- MATERIAL DE REFERÊNCIA WDCM

Os MR apresentam uma ou mais propriedades certificadas por um procedimento tecnicamente validado e realizadas por uma entidade competente. A homogeneidade é um requisito indispensável e significa que apresenta o mesmo valor dentro da mesma unidade e entre todas as unidades do mesmo material. O material de referência é estável durante as condições de transporte e armazenamento. Esta estabilidade refere-se tanto às propriedades certificadas quanto à matriz. A rastreabilidade a padrões de referência nacionais ou internacionais é refletido no certificado fornecido. Os valores certificados são apresentados com uma incerteza associada.

A existência de culturas puras de microrganismos permite a obtenção de *stocks* de trabalho que serão utilizados no controlo de qualidade do Laboratório. Estas culturas são conservadas, reconstituídas e utilizadas segundo especificação do fornecedor, de tal forma que minimize a possibilidade de contaminação cruzada, mutação ou alteração das características típicas. Depois de inoculadas no meio não seletivo gelosado *Nutrient Agar* da *Oxoid*, são conservadas e utilizadas quando necessário.

Em relação à estabilidade, considera-se que, depois de inoculados no meio gelosado não nutritivo os *stocks* de trabalho apresentam um mês de validade conservados a $(5\pm3)^{\circ}\text{C}$. As subculturas dos *stocks* de trabalho em placas de Petri têm validade de 5 dias conservadas a $(36\pm2)^{\circ}\text{C}$. As culturas e subculturas dos *stocks* de trabalho depois de utilizadas são descontaminadas. São efetuadas semanalmente ações de controlo às subculturas dos *stocks* de trabalho (ISO 11133, 2014).

b) Branco analítico

Com a introdução de branco pretende-se avaliar as condições de esterilidade de todo o processo analítico. Não se deve verificar qualquer tipo de crescimento. Realiza-se uma vez por dia sempre que existirem análises para cada parâmetro com água destilada esterilizada (Lightfoot e Maier, 2003).

c) Duplicados analíticos

É executado um por dia sempre que existirem análises. Já no que concerne à avaliação dos resultados obtidos, o Laboratório segue a tabela de *Lightfoot* para resultados obtidos nas placas de Petri de 0 a 10ufc. Para valores nas placas de Petri de 11 a 100 e superiores a 100ufc o Laboratório tem determinados os respetivos critérios de precisão (CP) que são avaliados em cartas de amplitude de duplicados. Os resultados que estão fora do preconizado, considera-se como aceite o valor mais alto.

Para determinar o CP deve-se analisar 15 amostras positivas em duplicado incluindo todos os Técnicos. Cada série de duplicados é analisada por um só Técnico. Registrar os resultados da análise como D1 e D2. Calcular o Logaritmo (Log) de cada duplicado (LogD1 e LogD2). Se algum resultado do duplicado for menor que 1, adicionar 1 a ambos os resultados antes de calcular os Log. Expressar o resultado em L1 e L2. No caso de D1 e/ou D2 < 10 ufc utilizar a tabela de *Lightfoot*. Calcular (R) a diferença dos Log para cada par L1 e L2. Determinar a média da diferença dos Log: $\bar{R} = \frac{\sum RLog}{n}$;

$$\text{Determinar o CP} = 3.27 \times \bar{R} = \frac{\sum RLog}{n}$$

Para a análise em rotina, considera-se que um resultado em duplicado é aceite se, a diferença de amplitude dos Log é menor que o CP. Este, é atualizado anualmente utilizando as últimas 15 amostras positivas em duplicado, sendo que é aceite que 30% dos resultados estejam acima do CP. (Lightfoot e Maier, 2003; SMEWW, 2017).

d) Ensaio em Paralelo

São executados sempre que necessário, como por exemplo determinação/ atualização do valor de incerteza dos diferentes métodos (Lightfoot e Maier, 2003; RELACRE, 2016).

e) Positivo quantitativo

Sempre que se realizam análises é efetuado um ensaio de uma amostra contaminada. Pretende-se abranger todos os parâmetros permitindo desta forma a determinação dos CP e cálculo de incertezas (Lightfoot e Maier, 2003; SMEWW, 2017).

f) Cartas de controlo

Utilizam-se MR sob a forma de lenticulas, quinzenalmente, com vista ao controlo em rotina dos métodos. A utilização destes MR permite-nos elaborar cartas de controlo que utilizadas em rotina nos dão indicações de Alarme e Aviso pela existência de critérios de aceitação.

6.6.2 Controlo da qualidade externo (CQE)

No âmbito do CQE, o Laboratório participa no ensaio *Quality in Water Scheme* (QWAS) organizado pelo *LGC Standards*. Realiza o ensaio à amostra 413 *Potable Water*. Os ensaios envolvem amostras homogéneas e estáveis em que participam vários Laboratórios. O *LGC Standards* recolhe os dados, analisa e informa cada

participante sobre o seu desempenho, por comparação com outros Laboratórios. Existe uma calendarização das distribuições sendo que cada Laboratório estabelece um plano de participações a fim de evidenciar uma participação satisfatória.

A avaliação do desempenho global e individual é realizada ao parâmetro tendo em consideração o valor paramétrico de *Z-score*. Este é calculado atendendo à equação $Z\text{-score} = \frac{(x-X)}{\delta p}$ com x , média dos resultados de cada Laboratório, X , média de todos os Laboratórios e δp , desvio padrão do ensaio. Os resultados são insatisfatórios para $|Z| \geq 3$. É também realizada a apreciação de falsos positivos/ negativos. A apreciação global é satisfatória quando 80% dos resultados estão conforme.

Com a participação em EIL o Laboratório compara o seu funcionamento com outros Laboratórios nacionais e internacionais, identifica áreas em que possa ter problemas e demonstra aos clientes, aos outros Laboratórios e aos organismos de acreditação o compromisso do Laboratório com a qualidade (RELACRE, 2007; Wilson e Weir, 1995).

7 A implementação do método

O procedimento de implementação da Norma ISO segue a metodologia definida pelo Laboratório e está expressa num Procedimento Auxiliar de Microbiologia sendo da responsabilidade do Responsável Técnico.

Determinado método para ser utilizado em rotina com ou sem restrições deve evidenciar experiência prática para a sua realização. Após seleção do método e verificar que estão reunidas todas as condições necessárias ao seu ensaio o Laboratório dá início a uma série de atividades que visam evidenciar experiência prática.

7.1 Ensaio interlaboratoriais (EIL)

O Laboratório deve participar pelo menos numa distribuição com resultado satisfatório. Avaliar resultados de falsos positivos, falsos negativos e duplicados.

Neste sentido, o Laboratório participou no ensaio de aptidão *LGC Standards da Quality in Water Analysis Scheme* da amostra 413 *Potable Water*. A avaliação do *Z-score* do Laboratório foi de 0,3. A avaliação do desempenho individual dos Técnicos foi de A com 0,3, B com 0,1, C com 0,5, D com 0,2, E com 0,6 e F com 0,8. Não existiram falsos positivos e falsos negativos. A avaliação de duplicados dos Técnicos foi 100% satisfatória. A avaliação de tendências será apreciada a partir da terceira distribuição.

7.2 Carta Guia

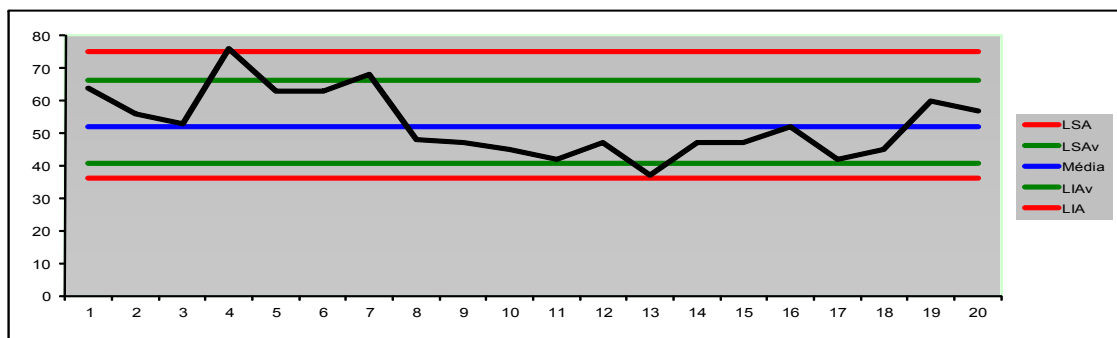
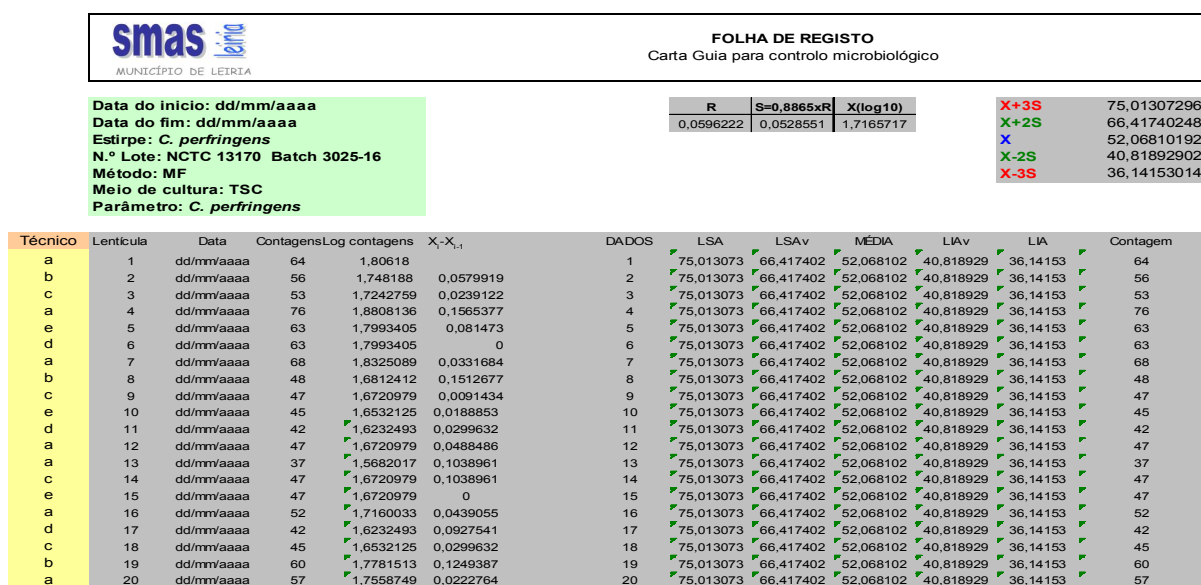
Após a elaboração da Carta Guia definitiva devem-se utilizar no mínimo 5 resultados consecutivos para constatar que o processo está sob controle.

A elaboração, atualização e avaliação da carta de controlo é da responsabilidade do Responsável Técnico. A sua utilização é da responsabilidade dos Técnicos que executam os ensaios.

Para a construção da FC da carta de controlo (tabela 8) deve-se proceder à análise de 20 (n) amostras de MR. Seguidamente executa-se a normalização dos dados Log10 para posteriormente se calcular a diferença de amplitudes ($x_i - x$). Com a diferença das amplitudes, determina-se a amplitude média R. O desvio padrão S é igual a $R \cdot 0.8865$. A média (\bar{x}) é equivalente aos dados Log10/n. Os limites superior e inferior de alarme (LSA e LIA) calculam-se $\bar{x} + 3s$ e $\bar{x} - 3s$. Determinar os seus Antilog ($10^{(LSA)}$ e $10^{(LIA)}$). Os limites superior e inferior de aviso (LSAv e LIAv) calculam-se $\bar{x} + 2s$ e $\bar{x} - 2s$. Determinar os seus Antilog ($10^{(LSAv)}$ e $10^{(LIAv)}$). Com a determinação destes limites estão reunidas as condições para construir a carta. É possível eliminar valores aberrantes que se encontrem fora dos limites de alarme, após identificar as suas causas. A carta é então colocada em rotina quinzenalmente sujeitando-se assim a uma criteriosa avaliação. A carta guia pode ser construída provisoriamente com 10 amostras de MR.

As cartas estão fora de controlo (tabela 9) quando se verifica: **A**- uma violação a $\bar{x} \pm 3s$; **B**- 2 observações fora em 3 observações realizadas na linha que excede o LA $\bar{x} \pm 2s$; **C**- 9 observações consecutivas de um lado da medida central; **D**- 6 observações dentro de uma linha mostrando invariavelmente uma diminuição ou aumento (Lightfoot e Maier, 2003).

TABELA 8- CONSTRUÇÃO DA CARTA GUIA

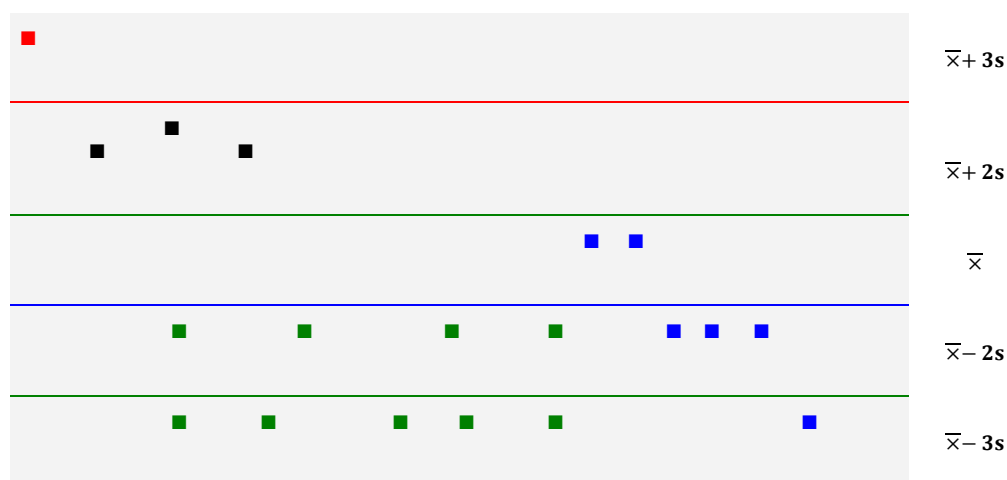


FC.M 01

Rev. 01
Data: 20/01/2012

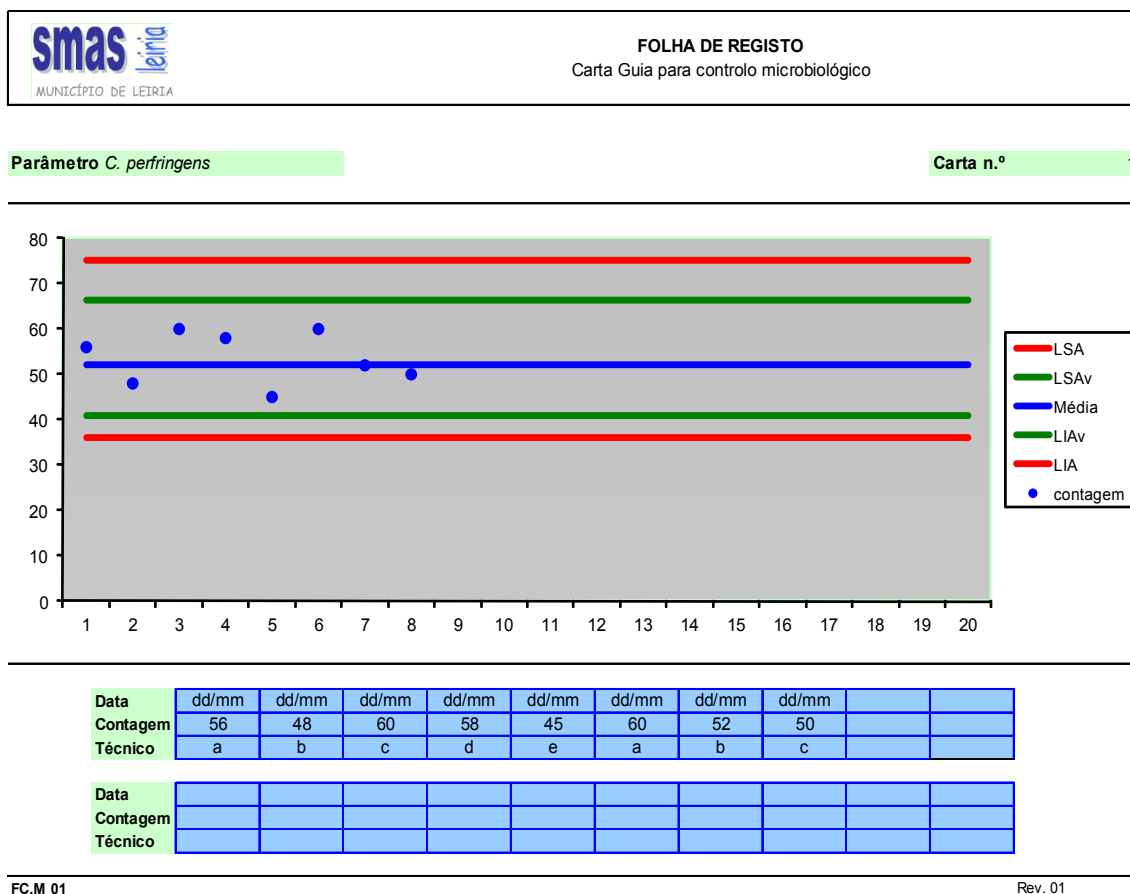
LEGENDA: dd/ mm/aaaa- DIA/ MÊS/ ANO; LIa- LIMITE INFERIOR DE ALARME; LIaV- LIMITE INFERIOR DE AVISO; LSAV- LIMITE SUPERIOR DE AVISO; LSA- LIMITE SUPERIOR DE ALARME; NCTC- NATIONAL COLLECTION OF TYPE CULTURES; MF- MEMBRANA FILTRANTE; EIXO DAS ORDENADAS- CONTAGENS; EIXO DAS ABCISSAS- LENTÍCULAS

TABELA 9- CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA AS CARTAS GUIA



LEGENDA: AS DIFERENTES CORES MOSTRAM O NÚMERO OBSERVAÇÕES E TENDÊNCIAS DE UMA CARTA FORA DE CONTROLO

A avaliação global da carta de controlo mostra um desempenho satisfatório. A avaliação das tendências evidencia um processo sob controlo. No decorrer deste período de tempo constata-se que os Técnicos obtêm resultados dentro dos limites e critérios de aceitação definidos na FC (tabela 10).



FC.M 01

Rev. 01
Data: 20/01/2012

TABELA 10- CARTA GUIA – REGISTO DE DESEMPENHO DOS TÉCNICOS

LEGENDA: CONTAGEM- UFC/ PLACA DE PETRI NO EIXO DAS ORDENADAS EM 20 ENSAIOS NO EIXO DAS ABCISSAS; LIA- LIMITE INFERIOR DE ALARME;

LIAV- LIMITE INFERIOR DE AVISO; LSAV- LIMITE SUPERIOR DE AVISO; LSA- LIMITE SUPERIOR DE ALARME; DD/ MM- DIA/ MÊS

7.3 Ensaio em Branco

Deve-se analisar pelo menos 5 resultados consecutivos do branco do dia tendo em consideração que não se deve verificar crescimento nas placas.

Foram analisados brancos consecutivos a amostras não se tendo verificado crescimento nas placas de TSC Agar (tabela 11).

TABELA 11- RESULTADOS DO ENSAIO DE BRANCOS

Ensaio Brancos	AMT	AMT	AMT	AMT	AMT	AMT	AMT	AMT	AMT	AMT
	0ufc dd/mm	0ufc dd/mm	0ufc dd/mm	0ufc dd/mm	0ufc dd/mm	0ufc dd/mm	0ufc dd/mm	0ufc dd/mm	0ufc dd/mm	0ufc dd/mm

LEGENDA: AMT- AMOSTRA; DD/ MM- DIA/ MÊS

7.4 Controlo positivo

Deve-se analisar em duplicado no mínimo 30 amostras das quais pelo menos se obtém 15 resultados positivos do controlo positivo do dia e com resultados de desempenho satisfatório.

Neste caso efetuados 16 controlos positivos em duplicado a amostras artificialmente contaminadas com a captação superficial do rio Liz (tabela 12). Neste sentido foram utilizados os primeiros 15 resultados para a determinação do valor do CP e respetiva carta de amplitude de resultados conforme explicitado em 6.6.1 Controlo de qualidade interno (CQI). Com o CP estabelecido de 0,205504 efetuaram-se mais 15 ensaios de amostras naturais para avaliar o desempenho do Laboratório e dos Técnicos ao nível da carta de amplitude de duplicados. Estes resultados das FC que constam na tabela 13 também serviram para avaliação no final do ano dos Técnicos.

TABELA 12- RESULTADOS DO ENSAIO DE POSITIVOS

Ensaio Positivos	AMT	AMT	AMT	AMT	AMT	AMT	AMT	AMT
	u.f.c./100ml	u.f.c./100ml	u.f.c./100ml	u.f.c./100ml	u.f.c./100ml	u.f.c./100ml	u.f.c./100ml	u.f.c./100ml
Técnico	12	11	15	23	67	40	68	66
	14	13	17	15	65	63	58	67
	a	a	a	c	b	f	f	e

Ensaio Positivos	AMT	AMT	AMT	AMT	AMT	AMT	AMT	AMT
	u.f.c./100ml	u.f.c./100ml	u.f.c./100ml	u.f.c./100ml	u.f.c./100ml	u.f.c./100ml	u.f.c./100ml	u.f.c./100ml
Técnico	65	19	23	22	13	17	18	26
	73	30	29	27	16	14	21	20
	d	d	e	b	c	a	b	d

LEGENDA: AMT- AMOSTRA

TABELA 13- DETERMINAÇÃO DO VALOR DO CRITÉRIO DE PRECISÃO E CARTA DE AMPLITUDE DE DUPLICADOS



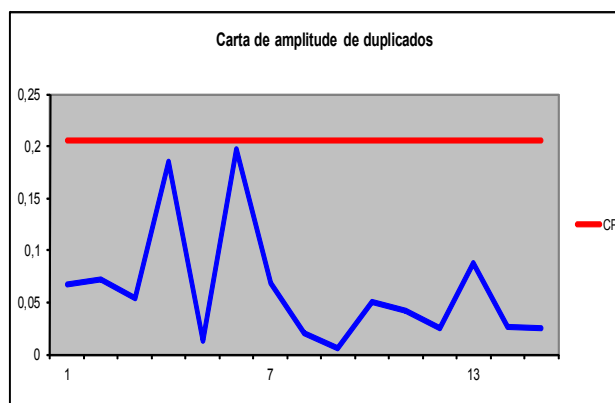
MUNICÍPIO DE LEIRIA

FOLHA DE REGISTO

Carta de amplitude de duplicados

Parâmetro: C. perfringens fosfatase

Ensaio	Data	D1	D2	Log D1	Log D2	Log(D1-D2)	Log(D1-D2)	CP
1	dd/mm	12	14	1,07918	1,14613	0,06695	0,066947	0,205504
2	dd/mm	11	13	1,04139	1,11394	0,07255	0,072551	0,205504
3	dd/mm	15	17	1,17609	1,23045	0,05436	0,054358	0,205504
4	dd/mm	23	15	1,36173	1,17609	0,18564	0,185637	0,205504
5	dd/mm	65	67	1,81291	1,82607	0,01316	0,013161	0,205504
6	dd/mm	40	63	1,60206	1,79934	0,19728	0,197281	0,205504
7	dd/mm	68	58	1,83251	1,76343	0,06908	0,069081	0,205504
8	dd/mm	86	82	1,9345	1,91381	0,02068	0,020685	0,205504
9	dd/mm	66	67	1,81954	1,82607	0,00653	0,006531	0,205504
10	dd/mm	65	73	1,81291	1,86332	0,05041	0,05041	0,205504
11	dd/mm	75	68	1,87506	1,83251	0,04255	0,042552	0,205504
12	dd/mm	71	67	1,85126	1,82607	0,02518	0,025184	0,205504
13	dd/mm	18	22	1,25527	1,34242	0,08715	0,08715	0,205504
14	dd/mm	16	17	1,20412	1,23045	0,02633	0,026329	0,205504
15	dd/mm	18	17	1,25527	1,23045	0,02482	0,024824	0,205504
ER/N								0,062845
CP								0,205504



FC.M 02

Rev. 00
Data: 07/04/2009



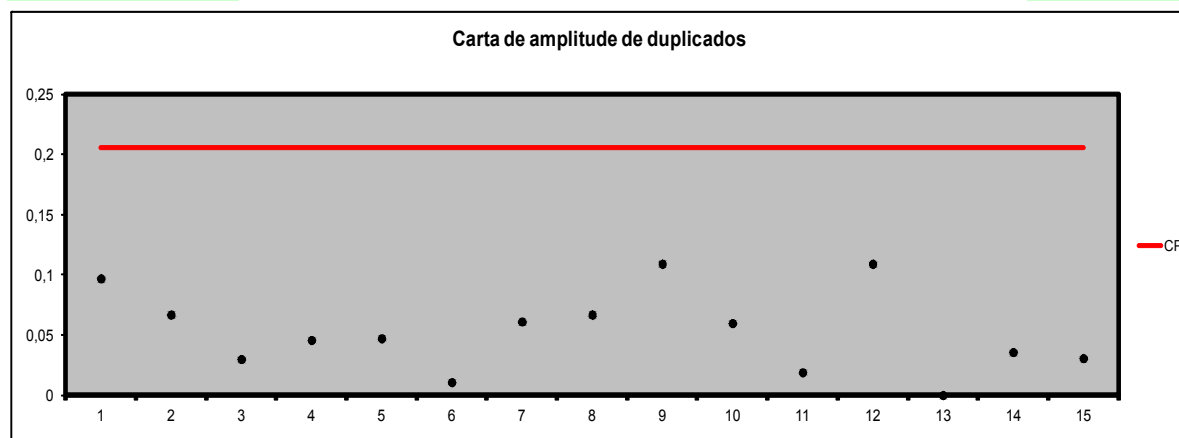
MUNICÍPIO DE LEIRIA

FOLHA DE REGISTO

Carta de amplitude de duplicados

Parâmetro: C. perfringens

Carta n.º 1



Técnico	Data	Resultado
a	dd/mm	15/12
b	dd/mm	18/21
a	dd/mm	14/15
d	dd/mm	36/40
d	dd/mm	61/68

Técnico	Data	Resultado
d	dd/mm	80/82
e	dd/mm	99/86
f	dd/mm	35/30
f	dd/mm	14/18
a	dd/mm	61/70

Técnico	Data	Resultado
c	dd/mm	45/47
c	dd/mm	63/49
b	dd/mm	15/15
f	dd/mm	76/70
e	dd/mm	88/82

Técnico	Data	Resultado
---------	------	-----------

Técnico	Data	Resultado
---------	------	-----------

FC.M 02

Rev. 00
Data: 07/04/2009

Data	D1	D2	Log D1	Log D2	Log(D1-D2)	Resultado	Data	D1	D2	Log D1	Log D2	Log(D1-D2)	Resultado	Data	D1	D2	Log D1	Log D2	Log(D1-D2)	Resultado
dd/mm	15	12	1,176091	1,079181	0,09691	0,09691	dd/mm	80	82	1,90309	1,913814	0,010724	0,010724	dd/mm	45	47	1,653213	1,672098	0,018885	0,018885
dd/mm	18	21	1,255273	1,322219	0,066947	0,066947	dd/mm	99	86	1,995635	1,934498	0,061137	0,061137	dd/mm	63	49	1,799341	1,690196	0,109144	0,109144
dd/mm	14	15	1,146128	1,176091	0,029963	0,029963	dd/mm	35	30	1,544068	1,477121	0,066947	0,066947	dd/mm	15	15	1,176091	1,176091	0	0
dd/mm	36	40	1,556303	1,60206	0,045757	0,045757	dd/mm	14	18	1,146128	1,255273	0,109144	0,109144	dd/mm	76	70	1,880814	1,845098	0,035716	0,035716
dd/mm	61	68	1,78533	1,832509	0,047179	0,047179	dd/mm	61	70	1,78533	1,845098	0,059768	0,059768	dd/mm	88	82	1,944483	1,913814	0,030669	0,030669

LEGENDA: CP- CRITÉRIO DE PRECISÃO; DD/ MM- DIA/MÊS; EM AMBAS AS CARTAS NO EIXO DAS ABSCISSAS- ENSAIO E NO EIXO DAS ORDENADAS- VALOR

do CP

7.5 Valores da incerteza intrínseca, intrínseca relativa, operacional e operacional relativa

A estimativa da incerteza das medições tratando-se de um requisito normativo segue o Procedimento Auxiliar de Microbiologia definido pelo Laboratório. A sua determinação e posterior atualização da FC é analogamente da responsabilidade do Responsável Técnico.

A incerteza da medição é definida como a medida de imprecisão de um parâmetro quantitativo que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser atribuídos à mensuranda.

A sua determinação segue a abordagem global pois nos métodos microbiológicos quantitativos, os fatores que influenciam as incertezas não são totalmente conhecidos de modo a permitir a aplicação da abordagem por componentes, uma vez que esta é omissa relativamente a contribuições significativas.

A variabilidade operacional U_o^2 é definida como a incerteza Técnica em condições de reprodutibilidade intermédia, resultando da combinação de todas as incertezas associadas aos passos técnicos do processo analítico. Inclui a variabilidade das subamostras, da mistura e da diluição da amostra para preparação da suspensão final. Inclui os possíveis efeitos de incubação e da incerteza da leitura do resultado.

Existe apenas uma estimativa de incerteza operacional por organismo alvo e método.

Estimada a variância operacional o seu valor é válido para o mesmo tipo de amostras até que surja uma mudança de equipamento ou dos Técnicos.

A incerteza intrínseca U_d^2 é definida como a incerteza da distribuição e prende-se com a variação inevitável sem causa que está associada à distribuição dos microrganismos na suspensão final e no sistema de quantificação.

A abordagem global assenta na estimativa da incerteza combinada do resultado final, com base na duplicação do processo analítico de pelo menos 30 amostras em paralelo.

Dos resultados inicialmente obtidos $nc1$ e $nc2$, efetua-se a sua conversão para a escala de logaritmos comum em $Lognc1$ e $Lognc2$ respetivamente.

Seguidamente determinar a sua diferença de amplitude.

Determinar a variância da reprodutibilidade U_R^2 fazendo $(\text{Lognc1} - \text{Lognc2})^2/2$.

Para determinar a variância da distribuição (variância intrínseca) U_d^2 calcular a média de nc1 e nc2 e fazer $0,1886/\text{nci}$. Achar a Variância operacional $U_o^2 = U_R^2 - U_d^2$. A variância da distribuição relativa $U_{d,rel}^2$ (variância intrínseca relativa) determina-se por $U_d^2 * 5,3019$.

Assim, a incerteza intrínseca U_d é $\sqrt{U_d^2}$. A incerteza intrínseca relativa $U_{d,rel}$ é $\sqrt{U_{d,rel}^2}$. A Variância operacional relativa $U_{o,rel}^2$ determina-se por $U_o^2 * 5,3019$. Igualmente, a incerteza operacional U_o é $\sqrt{U_o^2}$. A incerteza operacional relativa $U_{o,rel}$ é $\sqrt{U_{o,rel}^2}$.

Quando solicitado pelo cliente, o Laboratório calcula a incerteza combinada do resultado analítico. O Laboratório poderá também calcular a incerteza combinada expandida com intervalo de confiança de 95% igualmente de acordo com o exemplo prático.

O Boletim de Ensaio especifica a forma como a incerteza é apresentada (combinada ou expandida). Assim, para calcular a incerteza combinada de um novo resultado U_C (nc) superior a 10ufc, fazer $\sqrt{0,1886/\text{nc} + U_o^2}$. Se o resultado for inferior a 10ufc, fazer, $\sqrt{0,1886/\text{nc}}$. Para ambos os casos a incerteza combinada relativa do resultado U_C obtém-se multiplicando por 2,303. Multiplicando por 2 obtemos a incerteza combinada relativa expandida (tabela 14) (RELACRE, 2016; ISO 29201, 2012).

TABELA 14- DETERMINAÇÃO DOS VALORES DA INCERTEZA

smas

laboratório

Ministério de Saúde

FC-M 03

Rev. 01
26-07-2016

LEGENDA: AMT- AMOSTRA; DD/ MM- DIA/ MÊS

7.6 Repetibilidade e reprodutibilidade

A determinação da repetibilidade e reprodutibilidade segue igualmente o Procedimento Auxiliar de Microbiologia definido pelo Laboratório. A sua determinação e posterior atualização também é da responsabilidade do Responsável Técnico.

A repetibilidade “r” pode ser definida como a proximidade entre os resultados de medidas sucessivas do mesmo mensurando realizadas nas mesmas condições de medição enquanto que a reprodutibilidade “R” é definida como a proximidade entre os

resultados das medições no mesmo mensurando realizada sob condições de medição alteradas.

A determinação destas variáveis foi levada a cabo recorrendo à máquina de calcular Casio 880p função *memory* 6500. O meio de cultura de TSC Agar avaliado foi o lote L94. Considerando a repetibilidade $r=2,8S_r$ com S_r definido como desvio padrão da repetibilidade, obtemos os seguintes resultados (tabela 15) expressos em ufc/ 100ml. Participou 1 Técnico num único dia (ISO/TR 13843, 2000).

TABELA 15- DETERMINAÇÃO DA REPETIBILIDADE

Repetibilidade										
ufc/100ml										
Técnico	59	56	63	61	59	56	58	59	60	60
A dd/mm										
Sr=2,13										
Repetibilidade= $2,8 \times 2,13 = 5,964$ ($5,964 \times 100$)=0,05964										

LEGENDA: DD/ MM- DIA/ MÊS

No que diz respeito à reprodutibilidade $R=2,8S_r$ também com S_r definido como desvio padrão da repetibilidade, obtemos os seguintes resultados (tabela 16) expressos em ufc/ 100ml. Participaram 5 Técnicos em 2 dias diferentes.

TABELA 16- DETERMINAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE

Reprodutibilidade										
ufc/100ml										
Técnico	A dd/mm	B dd/mm	C dd/mm	D dd/mm	E dd/mm	A dd+1/mm	B dd+1/mm	C dd+1/mm	D dd+1/mm	E dd+1/mm
	59	62	64	60	66	49	50	67	61	56
Sr=6,15										
Reprodutibilidade= $2,8 \times 6,15 = 17,22$ ($17,22 \times 100$)=0,1722										

LEGENDA: DD/ MM- DIA/ MÊS

8 A Auditoria interna

Conforme previsto aquando do levantamento de necessidades e após a implementação do método foi solicitada a Auditoria interna a um Auditor externo pertencente à bolsa de Auditores do IPAC. De referir que esta Auditoria não se encontrava no programa anual de auditorias. Da abordagem baseada em evidências

aos vários domínios auditados o Relatório final mostra que não existem constatações ao cumprimento do referencial normativo. Neste sentido estão reunidas todas as condições para o Laboratório solicitar ao IPAC a respetiva Auditoria de extensão.

9 Considerações finais

A implementação da ISO 14189 *Water Quality- Enumeration of Clostridium perfringens- Method using membrane filtration* no Setor de Análises Microbiológicas do Laboratório de Controlo de Qualidade dos SMAS de Leiria só agora é levada a cabo por exigências legislativas. Estranha-se que técnicas ou procedimentos cancerígenos para os Técnicos sejam obrigatórios nos tempos que correm quando existem outros métodos que podem ser utilizados como métodos alternativos conforme previsto no artigo 28 do Decreto-Lei n.º 306/ 2007. Neste sentido a Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (RELACRE) pelo Grupo de Trabalho de Microbiologia, está a elaborar um estudo para aprovação da Entidade Reguladora dos Serviços de Água e Resíduos (ERSAR) que demonstra a equivalência entre o método ISO obrigatório e o método alternativo (método interno SMAS de Leiria) através da aplicação da Norma ISO 17994, 2014. O mesmo Grupo de Trabalho já elaborou um estudo similar para a quantificação de bactérias coliformes e *E. coli* que se encontra em fase de apreciação na Comissão Europeia.

A preparação e utilização do reagente do teste para a fosfatase conduz à utilização de uma *hotte* que não pertencendo ao equipamento do Laboratório de Microbiologia obriga a realizar o teste no Setor de Análises Físico-Químicas. Esta situação causa naturalmente entropia interferindo no normal funcionamento de ambos os Laboratórios.

A instabilidade desse mesmo reagente obriga a filtrações sucessivas para remover o precipitado em cada utilização o que se reconhece não ser conveniente atendendo que este procedimento não é seguro para os Técnicos.

A realização do teste da fosfatase como fator de decisão se estamos na presença de *C. perfringens* é bastante dúbio uma vez que existe dificuldade na interpretação da cor resultante da reação. Acresce o facto de a cor continuar a evoluir após o tempo preconizado de 3 a 4 minutos.

Outra dificuldade também evidenciada prendeu-se com a constatação de que o controlo negativo *C. bifermentans* WDCM 00079 por vezes era positivo o que gerava

algum desconforto nos Técnicos comparativamente com os demais métodos/parâmetros que o Laboratório tem implementados.

No entanto, este método ISO apresenta um tempo de resposta mais rápido em 24h comparativamente com o método interno. Contudo esta circunstância não é relevante para o cliente interno uma vez que não existem incumprimentos ao valor paramétrico reportados no portal ERSAR. No caso dos clientes externos mais 24h na emissão de um Boletim de Ensaio não é valorizado quando o objetivo é perceber se o seu furo/fontenário são próprios para o consumo humano.

Apesar do exposto nestas considerações a adequação ao uso está garantida uma vez que a implementação descrita cumpre as exigências da legislação em vigor e da própria Norma ISO 14189 de 2013.

10 BIBLIOGRAFIA

AJC, 2009, Esterilizadores verticais a vapor, MO-003/02 P.

Decreto-Lei n.º 152/ 2017 de 7 de dezembro, Diário da República, 1ª série- N.º 235, Ambiente.

Decreto-Lei n.º 306/ 2007 de 27 de agosto, Diário da República, 1ª série- Nº 164, Ministério do ambiente, do ordenamento do território e do desenvolvimento regional.

ERSAR, Recomendação ERSAR nº 01/ 2017, Procedimento para a colheita de amostras de água para consumo humano em sistemas de abastecimento. ERSAR, Lisboa, Portugal.

Faster, 2005, Operating and maintenance manual, 0006EN- Rev. 05.

Geldreich E. E., 1996, Microbial quality of water supply in distribution systems, Lewis Publishers is an imprint of CRC Press LLC.

ISO 5667-3, 2012, Water quality- Sampling- Part 3: Preservation and handling of water samples.

ISO 5667-5, 2006, Water quality- Sampling- Part 5: Guidance on sampling of drinking water from treatment works and piped distribution systems.

ISO 7218, 2007, Microbiology of food and animal feeding stuffs -- General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 11133, 2014, Microbiology of food, animal feed and water -- Preparation, production, storage and performance testing of culture media.

ISO 11737-1, 2006, Sterilization of health care products- Microbiological methods- Part 1: Determination of a population of microorganisms on products.

ISO 14189, 2013, Water quality- Enumeration of *Clostridium perfringens*- Method using membrane filtration.

ISO 17994, 2014, Water quality- Requirements for the comparison of the relative recovery of microorganisms by two quantitative methods.

ISO 19458, 2006, Water quality- Sampling for microbiological analysis.

ISO 29201, 2012, Water quality- The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods.

ISO/ TR 13843, 2000, Water quality- Guidance on validation of microbiological methods.

Lightfoot N. F. e Maier E. A., 2003, Análise Microbiológica de Alimentos e Água- guia para a garantia da qualidade, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa Portugal.

NHS- National Standard Method W5, 2005, Enumeration of *Clostridium perfringens* by membrane filtration, Health Protection Agency, Issue n.º 3.1 by standards laboratory on behalf of the regional food, water and environment microbiologists, United Kingdom.

NP EN ISO/ IEC 17025, 2005, Requisitos gerais de competência para Laboratórios de ensaio e calibração.

Precisa, 2005, Operating instructions, 350-8112-900b1.

RELACRE, Guia RELACRE 6, 2007, Acreditação de Laboratórios de ensaio microbiológicos, RELACRE, Lisboa, Portugal.

RELACRE, Guia RELACRE 29, 2016, Estimativa de incerteza em ensaios microbiológicos de águas, RELACRE, Lisboa, Portugal.

SMEWW, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition by Rice E. W., Eaton A. D. e Baird R. B., 2017, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington.

WHO, World Health Organization, International Program on Chemical Safety, 1996, Guidelines for drinking- water quality, Volume 2- Health Criteria and Other Supporting Information, World Health Organization, Geneve.

Wilson S. e Weir G., 1995, Food and drink laboratory accreditation- A practical approach, 1st edition, Chapman and Hall, London.